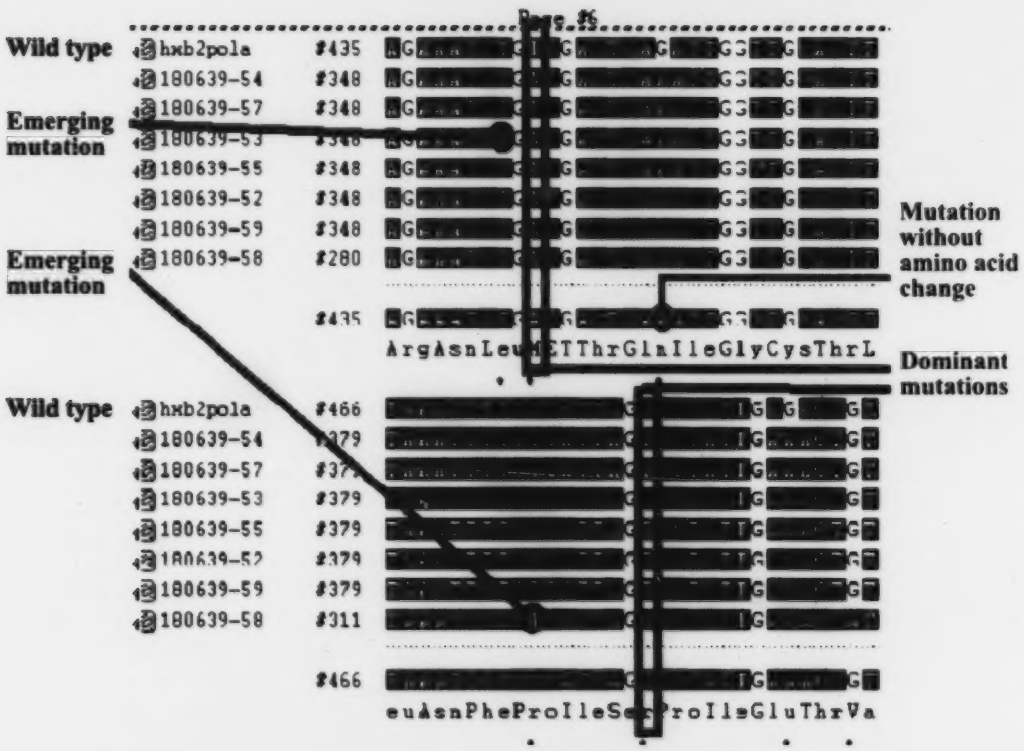
Health Canada Santé Canada

Workshop on HIV Drug Resistance Surveillance

Final Report



March 21, 2002

Canada

Our mission is to help the people of Canada
maintain and improve their health.

Health Canada

© Her Majesty the Queen in Right of Canada, represented by the Minister of Public Works and Government Services Canada, 2002
Cat. N° H39-642/2002
ISBN 0-662-66838-3

103-01250/

Workshop on HIV Drug Resistance Surveillance

March 21, 2002
Ottawa, Canada

Final Report

Prepared by
Sean Hosein and Theodore de Bruyn

Table of Contents

Executive Summary 1

Introduction 5

Surveillance of Primary Drug Resistance

1. **Prevalence and Determinants of Primary Drug Resistance in Canada** 7
   Dr. Gaya Jayaraman, Centre for Infectious Disease Prevention and Control, Health Canada

2. **British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS: Recent Trends and Challenges in HIV Drug Resistance Testing** 9
   Mr. Rick Galli, British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS

3. **Polaris Study: Transmission of Drug-Resistant HIV-1 in Ontario** 11
   Mr. Richard Pilon, Centre for Infectious Disease Prevention and Control, Health Canada, on behalf of the Polaris Study group.

4. **Multi-drug Resistance in Quebec Primary HIV-1 Infection** 12
   Dr. Bluma G. Brenner, McGill AIDS Centre, McGill University

5. **The SPREAD Study** 14
   Dr. Rob Schuurman, University Medical Centre, Utrecht, The Netherlands

6. **Discussion** 16

Laboratory Methods Available for Analysis of Drug Resistance for Surveillance Purposes

7. **Current Technologies for Drug Resistance Identification** 17
   Mr. Tim Gleeson, National Laboratory for HIV Genetics, Centre for Infectious Disease Prevention and Control, Health Canada

8. **Evaluation of Genotypic Drug Resistance Assays** 19
   Mr. Richard Pilon, Centre for Infectious Disease Control and Prevention, Health Canada

9. **Reports from Provincial Public Health Laboratories** 21

   Alberta 21
   Ms Linda Chui, Microbiology and Public Health Laboratory, University of Alberta Hospital

Quebec 21
Dr Hugues Charest, Laboratoire de santé publique du Québec;
Mme Micheline Fauvel, Laboratoire de santé publique du Québec

Manitoba 22
Dr. Magdy Dawood, Cadham Provincial Laboratory

10. Discussion 23

Standardized Approaches to Identify Mutations Significant for Drug Resistance Surveillance

11. Approach Used by the Centre for Infectious Disease Prevention and Control to Identify HIV Drug Resistance Mutations for Surveillance Purposes 24
Mr. Tim Gleeson, National Laboratory for HIV Genetics, Centre for Infectious Disease Prevention and Control, Health Canada

12. Discussion 24

Clinical and Policy Perspectives on HIV Drug Resistance Testing

13. Clinical Perspectives 27
Dr. Andrew Badley, Division of Infectious Diseases, Ottawa Hospital;
Dr. Bill Cameron, Division of Infectious Diseases, Ottawa Hospital;
Dr. Dan Gregson, Infectious Diseases, Calgary Laboratory Services

14. Policy Perspective 28
Mr. David Hoe, HIV/AIDS Policy, Coordination and Programs Division, Health Canada

Summary 29
Dr. Chris Archibald, Centre for Infectious Disease Prevention and Control, Health Canada

Appendix A: List of Invited Participants 30

Appendix B: Presentations 34

Executive Summary

On March 21, 2002, the Centre for Infectious Disease Prevention and Control, Health Canada, convened a workshop on HIV drug resistance surveillance. Experts from across the country and the European Union were in attendance (see Appendix A for a list of participants).

The main purpose of the meeting was to discuss a process to standardize laboratory methods of detecting HIV gene mutations and to interpret them in order to track the incidence and prevalence of HIV drug resistance in Canada.

This report summarizes the presentations and discussion of the workshop. Additional data from the presentations are provided in Appendix B.

Objectives of the workshop

The objectives of the workshop were as follows:

- to present and discuss results from the Canadian HIV Strain and Drug Resistance Surveillance Program;
- to share knowledge of available laboratory methods for the genetic analysis of HIV primary drug resistance for surveillance purposes;
- to explore approaches to standardizing the interpretation of genetic drug resistance results;
- to discuss clinical, public health, and policy implications of drug resistance detected at the time of HIV diagnosis (primary drug resistance).

Expected outcomes of the workshop

The expected outcomes of the workshop were as follows:

- review of data sources and laboratory methods relevant for the surveillance of primary HIV drug resistance in Canada;
- discussion of processes to standardize the definition of mutations that are significant for surveillance purposes;
- consideration of the implications of current findings for clinical and policy purposes;
- discussion of future directions for the surveillance of drug resistance in Canada.

HIV drug resistance

It has long been known that HIV has the ability to develop resistance to anti-retroviral drugs. The virus develops changes – called mutations – in its genetic material that confer the ability to counteract the action of the drugs. When viral suppression is not complete in people receiving anti-retroviral drugs, virus with drug resistance mutations can develop and proliferate. This is called secondary drug resistance.

What is particularly troubling is that drug resistance mutations are now appearing in some newly infected people who have never received anti-retroviral therapy. This is called primary drug resistance. In some cases the mutations confer resistance to one class of drugs; in other cases they have a broader effect and confer resistance to two or more classes of anti-retroviral drugs. This is called multi-drug resistance.

In Canada, the prevalence of primary resistance to at least one anti-retroviral drug is between 4.5% and 20%. The prevalence of primary resistance to two or more classes of anti-retroviral drugs is between 0.3% and 9.9%.[1] Data from Quebec and Ontario suggest that primary drug resistance mutations persist over time, even in the absence of anti-retroviral therapy.

Public health and policy implications

Drug resistance and the transmission of drug-resistant virus has a number of public health and policy implications, including the following:

- Drug resistance increases the complexity and reduces the efficacy of anti-retroviral treatment regimens. What will be the impact of increased prevalence of resistance mutations on anti-retroviral treatment?
- What are the correlates between drug resistance testing and clinical outcomes in people with HIV? Not all drug resistance mutations are clinically relevant.
- What is or will be the role of drug resistance testing in clinical care? At present it appears to be of limited value in responding to treatment failure, but its role may change if more people are infected with drug-resistant virus.
- Is resistance testing and the ability to interpret test results equally distributed across the country? Informal discussion at the workshop suggests that it is not. What impact is this going to have on the care of people with HIV?
- What are the clinical and economic implications of primary drug resistance? Data suggest that drug resistance mutations in people who have never received anti-retroviral therapy can persist for an extended period, up to 5 years in the Quebec Primary Infection Study.

---

1 Centre for Infectious Disease Prevention and Control, Health Canada. *HIV/AIDS Epi Update: Primary HIV anti-retroviral drug resistance in Canada.* April 2002.

- What efforts are being made to prevent or minimize transmission of drug-resistant strains of HIV? This is a complex area, involving not only HIV prevention in reducing the transmission of the virus but also care and treatment, and support in preventing and managing the development of drug-resistant virus in people receiving anti-retroviral drugs.

Surveillance of drug resistance

It is clear that the surveillance of drug resistance mutations in Canada needs to be intensified and coordinated if the country is to have a more complete picture of the prevalence of drug resistance and the transmission of drug-resistant virus in the population. Several research projects are currently under way (including studies in British Columbia, Ontario, and Quebec), and a collaborative surveillance program has been established (the Canadian HIV Strain and Drug Resistance Surveillance Program). Information shared by scientists from these initiatives was an important outcome of the workshop.

Participants attending the workshop identified several issues as needing further attention:

- Which mutations should be counted as significant for surveillance purposes? This point arises because HIV mutates at a relatively high rate, and not all mutations confer drug resistance. In addition, the list of mutations that are significant for purposes of epidemiologic surveillance may be different from the list of mutations that are significant for purposes of clinical care. Various categories of mutations were considered:
  - primary mutations (associated with drug resistance in and of themselves and not previously observed in untreated individuals);
  - secondary mutations (associated with drug resistance only in association with primary mutations and observed in increased prevalence among treated individuals as compared with untreated individuals);
  - revertant mutations (located on a primary or secondary mutation site, indicating that a drug-resistant virus has partially reverted to wild-type virus).
- What are the implications of HIV-1 non-B subtypes for drug resistance, drug resistance testing, and drug resistance surveillance? There is an approximately 8% prevalence of non-B subtypes in Canada. Resistance testing technology and databases designed for subtype B may not detect mutations in non-B subtypes. Knowledge of the behaviour of drug-resistant non-B subtypes relative to wild-type non-B subtypes is limited.
- Laboratories in Canada are not using the same methods and equipment. Implementation of quality control and standardization programs for drug resistance testing would be an important step towards improved national drug resistance surveillance.

Next steps

There is a clear and pressing need to produce a list of mutations, including primary mutations and selected secondary mutations, that are relevant to the surveillance of drug resistance. The definitions of these mutations need to be clarified and confirmed. Health Canada will work with its national partners to develop a list of mutations to be tracked in surveillance and research. Simultaneously, it will work with its international partners – the Centers for Disease Control and Prevention (USA), the European Union (SPREAD), the World Health Organization – to share information and achieve consensus on the mutations to be tracked.

Introduction

On March 21, 2002, the Centre for Infectious Disease Prevention and Control (CIDPC), Health Canada, convened a workshop on HIV drug resistance surveillance. Experts from across the country and the European Union were in attendance (see Appendix A).

The main purpose of the meeting was to discuss a process to standardize laboratory methods of detecting HIV gene mutations and to interpret them in order to track the incidence and prevalence of HIV drug resistance in Canada.

This report summarizes the presentations and discussion of the workshop. Additional data from the presentations are provided in Appendix B.

Objectives

The objectives of the workshop were as follows:

- to present and discuss results from the Canadian HIV Strain and Drug Resistance Surveillance Program;
- to share knowledge of available laboratory methods for the genetic analysis of HIV primary drug resistance for surveillance purposes;
- to explore approaches to standardizing the interpretation of genetic drug resistance results;
- to discuss clinical, public health, and policy implications of drug resistance detected at the time of HIV diagnosis (primary drug resistance).

Outcomes

The expected outcomes of the workshop were as follows:

- review of data sources and laboratory methods relevant for the surveillance of primary HIV drug resistance in Canada;
- discussion of processes to standardize the definition of mutations that are significant for surveillance purposes;
- consideration of the implications of current findings for clinical and policy purposes;
- discussion of future directions for surveillance of drug resistance in Canada.

Definitions

Primary drug resistance:

...resistance to anti-retroviral drugs seen in individuals who have never received anti-retroviral therapy (ART-naïve), presumably due to transmission of drug-resistant virus at the time of infection.

Secondary drug resistance:

...resistance to drugs seen among individuals already taking treatment (treatment-experienced), presumably due incomplete suppression of the virus, leading to treatment failure.

Multi-drug resistance:

...resistance to more than one class of anti-retroviral drugs (nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors or NRTIs, non-nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors or NNRTIs, and protease inhibitors or PIs).

Primary mutations:

...mutations in the viral sequence that in themselves are strongly associated with drug resistance and that have not previously been observed in untreated individuals.

Secondary mutations:

...mutations in the viral sequence that are seen in increased prevalence among treated individuals when compared with untreated individuals and that are associated with drug resistance only in combination with other primary mutations.

Phenotypic resistance:

...phenotypic resistance tests (or assays) measure the amount of drug required to inhibit replication in the virus relative to wild-type virus.

Genotypic resistance:

...genotypic resistance tests (or assays) identify mutations in the viral sequence suspected of being, or shown to be, associated with resistance to drugs.

Surveillance of Primary Drug Resistance

1. Prevalence and Determinants of Primary Drug Resistance in Canada

Dr. Gaya Jayaraman, Centre for Infectious Disease Prevention and Control, Health Canada

The goals of the Canadian HIV Strain and Drug Resistance Surveillance Program (CHSDRSP) include the following:

- to assess genetic markers for primary anti-retroviral drug resistance;
- to track the prevalence of primary drug resistance in order to develop population recommendations for the initial treatment of ART-naïve patients (especially in cases of pregnancy and post-exposure prophylaxis);
- to use transmission of drug-resistant strains of HIV as an indicator to help evaluate prevention programs and guide policy.

Currently, the CHSDRSP consists of the following partners:

- CIDPC, Health Canada;
- British Columbia Centre for Disease Control;
- Alberta Health and Wellness, Provincial Laboratory for Public Health, University of Alberta and University of Calgary;
- Saskatchewan Health;
- Manitoba Health;
- Ontario Public Health Laboratory;
- Nova Scotia Department of Public Health;
- Newfoundland Public Health Laboratory, Department of Health and Community Services.

Surveillance methods

The CIDPC, working with provincial/territorial partners, the National HIV/AIDS Laboratories and the Division of HIV/AIDS Epidemiology and Surveillance, has been assessing serum samples obtained for the purpose of diagnostic testing for drug-resistant HIV in ART-naïve individuals. Specifically, the CIDPC has been examining changes in the *pol* (polymerase) gene of HIV, which encodes the enzymes reverse transcriptase, protease, and integrase.

Viral samples from the study are sequenced and compared with stored wild-type virus called HXB2, which was isolated before the use of anti-retroviral therapy. Changes in the viral sequences are identified and compared with drug resistance databases located at Stanford University and the Los Alamos National Laboratory.

Preliminary results

At the workshop, the CIDPC reported data on 706 subjects whose viral sequences had been amplified. The following levels of resistance were found:

- 4.4% (31 individuals) had mutations in reverse transcriptase;
- 1.7% (12 individuals) had mutations in protease;
- 0.1% (1 individual) had mutations in both protease and reverse transcriptase.

Characteristics of individuals with primary drug resistance mutations were as follows:

- adults of both sexes;
- ages 16 to 69 years (majority between 15 and 39 years);
- risk factors for infection included male-to-male sex, injection drug use, heterosexual contact;
- most ethnicities represented;
- infection with HIV-1 subtypes A, B and C documented;
- resistance mutations found in samples from six provinces.

Conclusions

- The project has found evidence of primary drug resistance to RTIs and PIs.
- Multiple drug-resistant (MDR) HIV-1 was identified in at least one ART-naïve person.
- The prevalence of HIV-1 with primary drug resistance mutations is approximately 6.2%.
- Primary drug resistance was identified across different ages, regions, risk exposures, ethnicities, and HIV-1 subtypes (A, B and C).

Issues to consider

Dr. Jayaraman noted a number of unresolved issues that need to be considered in drug resistance surveillance. These include

- the quality of the samples obtained for drug resistance genotyping;
- the ability to identify mutations in minority subspecies;
- the ability to identify mutations in non-B subtypes;
- determination of which mutations to count (see the presentation in Appendix B for a preliminary list of primary mutations associated with drug resistance to NRTIs, NNRTIs, and PIs);
- lack of standardization in drug resistance testing;
- clinical and/or public health relevance of identified mutations.

As well, there are gaps in epidemiologic data – risk factors, ethnicity, year in which the person first received a diagnosis of HIV, treatment history – that the CHSDRSP has received. Moreover, the data represent only those subjects who have "stable" mutations.

Future directions

In the future, the CHSDRSP would like to

- collect sera and epidemiologic information on all newly diagnosed cases of HIV infection in order to provide an enhanced picture of the emergence of primary HIV drug resistance;
- use incidence testing to monitor trends in "recent" infections;
- use population-based phylogenetic analysis to assess transmission patterns;
- liaise with national stakeholders to influence prevention and treatment programs and policies;
- partner with other international organizations to monitor trends globally.

E. British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS: Recent Trends and Challenges in HIV Drug Resistance Testing

Mr. Rick Galli, British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS

The Centre for Excellence began to develop a sequence-based genotypic testing program for patient blood samples in 1997 and later collaborated with Tibotec-Virco NV for access to its VirtualPhenotype database. In 1999, the Centre offered HIV drug resistance testing as a clinical service in the province of British Columbia and, later that year, to the rest of Canada. To date, approximately 8,500 tests have been performed on samples from 1,500 British Columbia patients, and 7,000 tests from the rest of Canada.

Temporal trends in drug resistance testing

In analyzing data from the Centre for Excellence, researchers have found four basic trends:

- NRTIs: resistance to abacavir (Ziagen, ABC) was higher in 1996/1997 than in subsequent years, even though the drug was not in widespread use until 1999. This suggests that mutations can confer cross-resistance within the drug class.
- PIs: resistance to nelfinavir (Viracept) has remained "consistently higher" than to other PIs as a result of increased prevalence of the D30N mutation.
- NNRTIs: the prevalence of the K103N mutation has increased over time. Acquisition of just this one mutation confers resistance to all three currently licensed NNRTIs: efavirenz (Sustiva), delavirdine (Rescriptor) and nevirapine (Viramune).

- Overall, levels of primary drug resistance in B.C. appear to range between 4% and 8%.

Primary drug resistance to HIV-1: changes to $p6^{Gag}$

Researchers have recently focused on changes in the HIV $p6^{Gag}$ N-terminal region in ART-naïve individuals beginning anti-retroviral therapy. This region encodes a protein active in the late viral cycle, involving Pol packaging, particle size determination, and budding. According to a Swiss team,[2] changes to $p6^{Gag}$ are seen in up to 21% of patients treated with nucleoside analogues but in only about 5% of ART-naïve patients. As well, mutations to this area were shown to be associated with increased infectivity and the development of drug resistance. At the 2002 Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Smith et al presented data suggesting that increased frequency of changes to $p6^{Gag}$ in primary HIV infection is associated with increased incidence of infection with drug-resistant virus.[3]

Researchers at the Centre for Excellence recently reviewed data on an ART-naïve cohort of 431 subjects. The prevalence of $p6^{Gag}$ was 14.8%. Acquisition of changes to this region was associated with higher baseline plasma viral load and lower CD4+ cell count. However, mutations in the region were not associated with the acquisition of baseline drug resistance.

Variability of sequence-based HIV drug resistance testing

In a number of experiments, comparison of the Centre for Excellence's in-house genotyping methodology with that of Visible Genetic's Trugene product suggests a high level of concordance (approximately 99.0%) between the two methods.

Challenges in standardization of drug resistance for surveillance

There are several challenges to the creation of standardized drug resistance research:

- Currently, there are 16 anti-retroviral drugs in widespread use in Canada – a minimum of 1,100 choices for a combination of three drugs as a treatment regimen.
- There are at least 240 mutations associated with drug resistance.
- It is possible that some mutations may revert over time.
- Methods for interpreting results of resistance testing are not yet standardized – rules-based methods versus VirtualPhenotype.

---

2 Peters S, Muñoz M, Yerly S et al. Resistance to nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors mediated by human immunodeficiency virus type 1 p6 protein. *Journal of Virology* 2001;75(20):9644-653. Available at http://jvi.asm.org/content/vol75/issue20.

3 Smith D, Little SJ, Daar ES et al. Genetic variation in p6 in primary HIV infection. 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Abstract 357-M. Available at www.retroconference.org/2002/abstract/13195.htm

- Because adherence requirements to HIV treatment regimens are extremely high and regimens are complex, it should not be surprising that complex resistance mutations occur in users of anti-retroviral therapy.

The Centre for Excellence is engaged in several collaborations with other research teams – Research Diagnostics Inc. (Toronto) and the Forum for Collaborative HIV Research (George Washington University, Washington, D.C.) – to document the emergence of resistance mutations in conjunction with response to therapy. It is hoped that this will result in a large, multinational database correlating resistance with measures of outcome.

Polaris Study: Transmission of Drug-Resistant HIV-1 in Ontario

Mr. Richard Pilon, Centre for Infectious Disease Prevention and Control, Health Canada, on behalf of the Polaris Study group.

The Polaris study

The Polaris study is a 5-year observational study of a well-defined cohort of individuals who have recently become infected with HIV. The goals of Polaris are to

- determine why and how patients become infected (social and epidemiologic factors);
- characterize the infecting virus;
- determine the rate of transmission of drug-resistant HIV in Ontario;
- monitor changes in drug resistance over time;
- correlate findings with disease progression.

Enrollment

To enroll in the Polaris study, participants need to meet the following criteria:

- tested HIV-positive within the past 12 months *and* had previously tested HIV-negative within the past 2 years; or
- received an indeterminate HIV test result followed by a positive test result within 12 months.

Participants are interviewed in order to determine relevant socio-epidemiologic information, such as risk factor(s), test-seeking behaviour, and symptoms. Plasma specimens and clinical data are collected at baseline (shortly after study entry) and every 6 months for 5 years. Since 1998, more than 100 participants have been enrolled, and less than 5% per year have dropped out.

Results

HIV sequences are available for 63 of the 100 participants. Of these, 43 have been identified as ART-naïve. Five (11.6%) of the 43 have mutations associated with drug resistance. All mutations are linked to changes in the reverse transcriptase enzyme, conferring resistance to NRTIs and NNRTIs (see Appendix B). No resistance to PIs has been detected.

The mutations appear to persist over the course of the study, in some cases up to 4 years. Some mutations (V179D and V106A) cause the virus to have reduced replicative fitness over wild-type virus. In theory, viruses with these mutations should be replaced by more fit wild-type virus over time. Other mutations (M41L) do not appear to affect fitness and would be expected to be relatively stable.

Conclusions

- There is transmission of drug-resistant virus (primary drug resistance to NRTIs and NNRTIs in 11.6% of the study population).
- Transmitted drug-resistant virus persists in the absence of anti-retroviral therapy for up to 4 years after diagnosis of HIV infection.
- Further study is needed on individuals with primary drug resistance to determine what happens to different mutations in different individuals.

4. Multi-drug Resistance in Quebec Primary HIV-1 Infection

Dr. Bluma G. Brenner, McGill AIDS Centre, McGill University

The objectives of the Montréal Primary HIV-1 Infection Study are

- to determine the prevalence of drug resistance in primary HIV-1 infection;
- to assess changes in the genome of multi-drug resistant HIV over time;
- to ascertain the impact of multi-drug resistant HIV on viral load and CD4+ cell count;
- to assess the fitness of multi-drug resistant viruses relative to wild-type viruses.

Results

To date, the study has collected data on 137 individuals with primary HIV infection. Of these,

- 19% (27) have no detectable resistance mutations;
- over 68% (101) have detectable secondary mutations that, on their own, confer no phenotypic resistance;
- 4.8% (7) have single class mutations;
- 5.5% (8) have detectable multi-drug resistance.

The finding of 5.5% multi-drug resistance in Montréal is higher than that reported from other studies:

- Geneva (n = 82): 1.3%
- New York (n = 80): 3.8%
- California (n = 141): 2.1%

Data from the study on temporal trends in phenotypic resistance to specific classes of drugs (see Appendix B for details) suggest increasing prevalence over time (1996-2001) of resistance to NNRTIs. This is in concordance with data reported by the British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS.

Data from the study also suggest that

- multi-drug resistant HIV persists over time, perhaps because of viral reservoirs;
- infection with multi-drug resistant HIV appears to cause lower viremia than wild-type HIV (in one case of primary multi-drug resistant HIV, an increase in viremia was associated with re-infection with wild-type virus);
- multi-drug resistant HIV has impaired replicative fitness.

See Appendix B for further details.

The study group has observed that since October 2001 about 10% of subjects have non-B subtypes of HIV-1, usually C and A subtypes. Subtype C is very fit relative to other subtypes.

Conclusions

Data from the Montréal Primary HIV-1 Infection study indicate that

- 10.3% of primary HIV infection cases have drug resistance mutations;
- 5.5% of primary HIV infection cases acquire multi-drug resistant HIV;
- multi-drug resistant infections may persist over time;
- multi-drug resistant viral load is relatively low. The effect of re-infection with fitter virus needs to be studied;
- multi-drug resistant virus is relatively unfit. Individuals with multi-drug resistant HIV acquire it from a source person in whom multi-drug resistant virus constitutes a high percentage of that person's virus population;
- non-B subtype infections are present in 7.7% of Quebec patients and appear to be very fit. The effect of treatment in subjects with subtype C versus other subtypes needs to be studied.

The SPREAD Study

Dr. Rob Schuurman, University Medical Centre, Utrecht, The Netherlands

Introduction

The SPREAD study is a European surveillance program of HIV drug resistance. Countries currently participating in the study include Austria, Belgium, Denmark, Finland, Germany, Greece, Ireland, Italy, Luxembourg, the Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Spain, Sweden, and the UK. There are plans to enlarge SPREAD to include nine states that are newly associated with the European Union: Bulgaria, Cyprus, the Czech Republic, Estonia, Hungary, Latvia, Romania, Slovakia, and Slovenia.

The national infrastructure in each country will include a representative clinician, a representative virologist, and a representative epidemiologist. These will be linked, respectively, to the European Clinical Working Group, the European Virological Working Group, and the European Epidemiological Working Group.

Objectives

The objectives of the study are as follows:

- establishment of a European surveillance program;
- collection of comparable and reliable data on the transmission of HIV drug resistance;
- establishment of a network of reference laboratories;
- determination of the overall incidence and patterns of transmission of drug-resistant HIV over time in each country;
- investigation of the incidence of different HIV subtypes and the relation with mutational resistance patterns;
- analysis of the relation between the incidence of transmission and the nature of anti-retroviral consumption and guidelines;
- development of models to predict future trends in HIV drug resistance transmission.

Study population

The study hopes to recruit true seroconverters and newly diagnosed HIV patients:

- True seroconverters have not been exposed to anti-retroviral therapy and have had either a negative ELISA test and a positive plasma HIV-RNA, or a positive ELISA and an intermediate Western blot. They are the most interesting epidemiologically but are also the more difficult to recruit.
- Patients with newly diagnosed HIV have never been exposed to anti-retroviral therapy and have had either a positive ELISA and a positive plasma HIV-RNA, or a positive ELISA and a positive Western blot. They may themselves have an interest in resistance testing. However, in these patients

it is possible that wild-type virus may have outgrown resistant virus or that resistant virus has reverted to wild-type.

To help identify potential subjects, the use of peptide-based, detuned assays may be necessary. It may also be possible to conduct nested studies if donors and recipients can be matched.

Data collection

Data will be collected on the following:

- clinical and behavioural information: age, sex, area, immune status, route and date of transmission, risk factors, etc.;
- epidemiologic data: national HIV prevalence and incidence, geographic distribution, national treatment guidelines, consumption of anti-retroviral therapies;
- virologic data: viral load, genotype and phenotype resistance analysis, quality control data.

Resistance testing specifications

The study plans to conduct

- genotypic resistance testing of 4,000 samples, looking at changes in protease and reverse transcriptase genes (testing will take place in participating countries, with quality control);
- phenotypic resistance testing of 400 samples (testing will be centralized).

For information on the establishment and maintenance of a quality control network for genotypic testing, see Appendix B.

Collaboration

The SPREAD team is collaborating with other countries and agencies involved in HIV resistance surveillance, including

- EuroGuidelines Group;
- Centers for Disease Control and Prevention, United States;
- CIDPC, Health Canada;
- European AIDS Treatment Group;
- World Health Organization;
- other countries and organizations that have already developed experience in transmission of HIV drug resistance.

Discussion

Key points that emerged in the discussion after the above presentations were the following:

HIV-1 subtype C

The dominant strain of HIV-1 in Canada is subtype B. However, subtype C is present in Canada, at relatively low levels in British Columbia but at higher levels in Quebec (where there has been more investigation of this subtype). Subtype C has different mutation patterns than subtype B. Moreover, according to data from Quebec, subtype C appears to develop resistance to NNRTIs earlier and at lower concentrations of drug than subtype B.

The persistence of multi-drug resistance mutations

There was much discussion about the data reported from Quebec regarding the persistence of multi-drug resistance mutations over a period of 5 years. If, as it appears, multi-drug resistant virus was less fit than wild-type virus, one would expect the drug resistance mutations to revert back to wild-type, which would outgrow multi-drug resistant virus over time. Some participants felt that it would be useful if other research teams could confirm the stability of these mutations, given the public health implications of persistent primary drug resistance. While there was much interest in multi-drug resistance mutations, one participant noted that the workshop should not lose sight of the importance of key single resistance mutations.

The paradox of fitness and persistence

Participants observed, as already noted, that it is odd that mutations that conferred multi-drug resistance persisted, despite the fact that multi-drug resistant virus is less fit than wild-type virus. A number of theories were proposed to explain this phenomenon – it is known, for example, that HIV nucleic acid can be integrated into human DNA and that reservoir cells, such as T memory cells, can remain viable for decades – but it was clear that further research is required to understand it.

Public health concerns

There was some discussion of the impact of treatment interruptions and delayed anti-retroviral treatment in people with drug-resistant virus. Treatment interruptions and delayed anti-retroviral treatment lead to expansion and re-emergence of wild-type virus. Wild-type infections may yield higher viral loads than resistant virus infections, which may lead to increasing rates of HIV transmission as observed before the introduction of anti-retroviral therapy.

However, delayed treatment may be less critical than ensuring that, once therapy is contemplated, the therapy is correct for the person (this may include pharmacogenetic screening of the patient for drug metabolism and transportation polymorphisms) and that the person receives monitoring and support to maintain adequate drug pressure, thereby preventing breakthrough in viral load and the development of mutations.

Laboratory Methods Available for Analysis of Drug Resistance for Surveillance Purposes

Current Technologies for Drug Resistance Identification

Mr. Tim Gleeson, National Laboratory for HIV Genetics, Centre for Infectious Disease Prevention and Control, Health Canada

Introduction

There are currently two commonly used methods for the prediction and identification of microbial resistance: phenotypic resistance assays and genotypic resistance assays.

- Phenotypic resistance refers to the biologic characteristics of an organism in an environment that allow it to resist drugs.
- Genotypic resistance refers to the genetic markers of the biologic characteristics that confer resistance.

Phenotypic assays

Phenotypic assays measure the amount of drug required to inhibit replication in the virus relative to wild-type virus. This is done *in vitro* and is a direct measure of resistance. Two companies have developed standardized assays – Tibotec-Virco (recently acquired by Johnson and Johnson) and Virologic. These assays are amenable to high throughput. Recombinant viruses are generated to perform the assay, and these include the regions protease, most of reverse transcriptase, and part of gag.

However, there are significant drawbacks to the use of phenotypic assays:

- they are time consuming, requiring 2 to 6 weeks for results;
- they are highly labour-intensive and therefore costly;
- there is the possibility that the methodology of the assay may lead to laboratory artifacts (virus may develop resistance during the course of the test);
- antiviral activity of NRTIs varies between the assay and *in vivo;*
- changes in recombinant virus may not accurately reflect changes in the virus *in vivo*.

Genotypic assays

These assays

- are sequence-based;
- are relatively low in cost;
- do not require biosafety containment;
- measure drug susceptibility indirectly;
- detect mutations at levels too low for phenotypic assays.

Commercial genotypic assays are available from a number of sources, including

- Affymetrix (GeneChip)
- Innogenetics (Inno-LiPA)
- Visible Genetics (Trugene)
- Applied BioSystems (ViroSeq)

However, each of these assays has its drawbacks, as outlined below:

a. GeneChip

- requires prior knowledge of expected polymorphism;
- less reliable than nucleotide sequencing for detecting mutations;
- not capable of detecting insertions or deletions;
- unreliable at sequencing non-B subtypes on 'B' based chip tiling.

b. Inno-LiPA

- can detect only a subset of drug resistance mutations;
- relatively high rate (10%) of results cannot be interpreted (uncommon mutations at key points).

c. ViroSeq and Trugene

- specialized equipment required to perform the assay (thermocyclers, gel castings, specific sequencers);
- limited number of assays can be processed in a given time;
- moderate costs.

Evaluation of Genotypic Drug Resistance Assays

Mr. Richard Pilon, Centre for Infectious Disease Prevention and Control, Health Canada

Background

Drug resistance testing is increasingly important in the treatment of HIV infection, especially before anti-retroviral therapy is initiated or whenever therapy is to be changed. The development of drug resistance can lead to virologic failure. A number of studies have found that information on HIV resistance testing, particularly genotypic testing, can improve clinical outcome. There are several methods available for assessing HIV drug resistance, including sequence-based assays (ViroSeq, Trugene and in-house methods), hybridization assays (LiPA), and phenotyping (culture and *in vitro* assays).

Objectives

The objectives of the study are as follows:

1. Create a representative panel of plasma specimens from 100 HIV-1 infected patients with the following breakdown:
    - 40 patients taking more than three anti-retroviral drugs in virologic failure with a viral load greater than 50,000 copies;
    - 40 patients taking more than three anti-retroviral drugs in virologic failure with a viral load greater than 1,000 copies and fewer than 10,000 copies;
    - 10 ART-naïve patients, HIV-positive for at least 5 years, with a viral load greater than 50,000 copies;
    - 10 ART-naïve patients, HIV-positive for at least 5 years, with a viral load greater than 1,000 copies and fewer than 10,000 copies.
2. Evaluate two commercial assays (Perkin-Elmer and Visible Genetics) in two different laboratories versus in-house sequencing of several clones derived from each specimen (the gold standard).
3. Phenotype a subset of specimens to compare results from genotypic testing.
4. Make use of the findings to assist in the development of HIV genotypic testing programs.

The study will involve only HIV-1 subtype B.

For schematics of the methodologies, see Appendix B. There are differences among the methodologies in how they present or assess mutations:

- Perkin-Elmer lists all mutations previously shown to be related to drug resistance, with no interpretation of probable levels of resistance or suggestion as to which drug or class of drugs the mutation may be related. It does not distinguish between primary and secondary mutations.
- Visible Genetics lists relative resistance to a panel of drugs as well as the mutations and descriptions of their impact, based on database information.
- With in-house sequencing of clones, there are several reference-based, on-line resources (databases) used to assess resistance to the various drugs currently available.

Current status

So far, 32 specimens have been collected. Health Canada has completed Visible Genetics and Perkin-Elmer assays on these specimens. From each of 20 specimens, six clones have been prepared. Comparisons have not yet been done, and the laboratories remain blinded to information about the specimens in order that bias can be avoided in the analysis.

Preliminary study results

To date, the Health Canada team has obtained the following results:

- 10 specimens with high-level multi-drug resistance to all classes of available anti-retroviral drugs – RTIs and PIs – have been detected.
- Two specimens with resistance to RTIs, one with multi-drug resistance to RTIs, and three with resistance to PIs have been found.
- 14 specimens with no recognized resistance mutations have been found.
- Four failures with Visible Genetics and two with Perkin-Elmer have occurred.

The study expects to have all specimens collected by the summer of 2002. All three methods yield good sequence data. The genotype information provided by Visible Genetics is more complete than that from Perkin-Elmer. The sequences will be compared at the end of the study.

Reports from Provincial Public Health Laboratories

Alberta

Ms. Linda Chui, Microbiology and Public Health Laboratory, University of Alberta Hospital

The public health laboratories in Alberta have been conducting molecular tests for HIV since 1997. Genotypic resistance testing was begun in 1999, performed by the British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS. As of 2001, this service has been carried out in Edmonton.

The number of tests conducted to date and the number of failed tests are as follows:

- 1999: 49 tests, 7 failures (14.3%)
- 2000: 65 tests, 8 failures (12.3%)
- 2001: 78 tests, 7 failures (9.0%)

In 2002 a validation study was begun, comparing results from the Edmonton laboratory and the British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS. To date, in 13 of 15 cases there was concordance between the results of the Trugene assay and the Virco assay (for details, see Appendix B).

The study is ongoing but is expensive and labour intensive. There may be value in sharing data on the assays in use in the country.

Quebec

D[r] Hugues Charest, Laboratoire de santé publique du Québec;
M[me] Micheline Fauvel, Laboratoire de santé publique du Québec

The Quebec drug resistance testing program is designed for clinical monitoring. The three participating laboratories – the Laboratoire de santé publique du Québec, the Jewish General Hospital/McGill AIDS Centre, and the Centre hospitalier de l'Université de Montréal – use the Virco assay. The laboratories are connected to a central database that has the capacity to generate summary profiles of drug resistance (by HIV-1 subtype, by nucleotide, by anti-retroviral drug, etc.). For each individual test, a Virco antivirogram is generated showing the virtual phenotype and an interpretation of the results for the clinician.

Resistance testing can be requested in case of

- first treatment failure;
- subsequent treatment failure;
- new-born infant;
- pregnancy;

- primary HIV infection;
- other reasons.

A total of 459 tests had been performed as of March 2002. Data on the reason for testing are entered in the database after testing and are available for 378 tests:

- 68 tests were done for cases of first treatment failure.
- 165 tests were done for cases of subsequent treatment failure.
- 21 tests were done for pregnant women.
- 16 cases were done for primary HIV infection (it remains to be confirmed that these cases were, in fact, recent infections and not recent diagnoses).
- 30 tests were done for other reasons.
- For 78 tests no reason was given.

To date, 6.5% of tests (30 of 459) involved HIV-1 non-B subtypes.

Manitoba

Dr. Magdy Dawood, Cadham Provincial Laboratory

Drug resistance testing was first offered in Manitoba in 1999. The tests are currently performed by the British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS.

Since 1999, 267 tests have been performed for 156 patients. Fifteen patients (10% of all tested) are failing on treatment and have high viral load, but their drug resistance test results show them to be susceptible to anti-retroviral drugs. The reason for this is unclear; it could be the pharmacokinetics of the drugs or a failure of adherence to the treatment regimen. The number of specimens from patients with high viral load that cannot be typed is 15 (6%).

The genotypic test results for 49 specimens tested during 2001 were as follows:

- NRTs: 37 sensitive, 12 resistant;
- NNRTs: 29 sensitive, 20 resistant;
- PIs: 36 sensitive, 13 resistant.

Sixteen of these patients were resistant to only one class of drug, 13 were resistant to two classes, and one was resistant to all three classes of drug. Nineteen patients were found to be sensitive to all three classes of drug.

1.6 Discussion

Quality control is extremely important in molecular testing (it is incorporated into resistance testing programs in British Columbia and Quebec). However, at present there are no standards for quality control. There is an urgent need for a national standard quality control program for resistance testing. Dr. Schuurman extended an invitation to Canadian laboratories to participate in the European Union's quality control program for resistance testing (for details, see Appendix B).

Phenotypic testing is more time-consuming and costly than genotypic testing, and also requires level-three biosafety containment facilities. It should be used only in the event of ambiguous genotypic test results. Basic research on phenotypic resistance in HIV-1 non-B subtypes is required.

Given a number of factors (the small number of tests being done, cost, etc.), it is doubtful that private laboratories will be rushing to offer resistance testing in Canada in the near future.

Standardized Approaches to Identify Mutations Significant for Drug Resistance Surveillance

11 Approach Used by the Centre for Infectious Disease Prevention and Control to Identify HIV Drug Resistance Mutations for Surveillance Purposes

Mr. Tim Gleeson, National Laboratory for HIV Genetics, Centre for Infectious Disease Prevention and Control, Health Canada

The methods used by the CIDPC to identify HIV drug resistance were described (for details, see Appendix B). The National Laboratory for HIV Genetics has the capacity to sequence about 48 samples per day. The use of the NucliSens extractor has improved the speed and quality of RNA extraction. Dried blood spots, used in the past, do not provide consistent results; plasma/serum samples are now used for testing.

1E Discussion

Which mutations should be tracked?

The central issue of the discussion was which drug resistance mutations should be tracked from a surveillance perspective. The following categories of mutations were raised for consideration during the discussion:

- primary mutations that confer resistance to an anti-retroviral drug;
- primary mutations that confer cross-resistance to a class of anti-retroviral drugs;
- secondary mutations that, when present with other primary mutations, confer resistance to an anti-HIV drug;
- mutations indicating prior drug treatment;
- mutations suggesting that primary drug-resistant virus has partially reverted to wild-type virus in the absence of treatment.

The importance of secondary mutations arose several times during the discussion. Although secondary mutations by themselves may not be very significant, together, as they accumulate under the pressure of treatment, they may greatly affect the efficacy of therapy. It was suggested that samples that pre-date the introduction of protease inhibitors could provide baseline data for the identification of secondary mutations associated with resistance to PIs.

Standardization and currency

There is a high degree of concordance in the genetic sequences produced by the various genotypic testing kits, but there is a lack of standardization at the level of analysis or reporting. For instance, the L63 mutation is included in the Visible Genetics report but not in the Virtual Phenotype report. (Virco includes the mutation in the Virtual Phenotype analysis, but chooses not to show it on the report.)

Several databases are used to identify drug resistance mutations:

- International AIDS Society (IAS)
- Los Alamos National Laboratory
- Stanford University

However, these three databases only look at resistance mutations currently known to be clinically relevant. They do not take into account the possible resistance that could result from combinations of secondary mutations.

The U.S. Centers for Disease Control and Prevention is suggesting that the IAS list of primary drug resistance mutations be used.[4] One participant noted that the IAS list is at least 1 year behind the latest developments. There is a need for constant updating of the list of relevant mutations.

A proposed joint initiative

Dr. Schuurman presented a proposal for a joint European Union-United States-Canadian initiative to identify molecular indicators of resistance transmission (MIRT). The objectives of the initiative would be to

- define consensus criteria for identification of drug resistance transmission from a scientific, clinical, and epidemiologic perspective;
- develop an algorithm that enables analysis of sequences for MIRT deemed significant for scientific, clinical, and epidemiologic purposes;
- publish, disseminate, and use the criteria and algorithm in all further studies on drug resistance transmission, to enable the comparison of study results;
- create a web-accessible software package for easy identification of Molecular indicators of resistance in clinical samples and for use in all transmission studies;
- update the criteria and algorithm on an ongoing basis.

---

4 D'Aquilo RT, Schapiro JM, Brun-Vezinet F. Update on drug resistance mutations in HIV-1. *Topics in HIV Medicine* 2001;9(6):21-23.

Dr. Schuurman summarized the mutations that should be considered significant from a scientific, clinical, and epidemiologic perspective and proposed definitions for primary, secondary, and reversion molecular indicators of resistance transmission. For details of the proposed initiative, see Appendix B.

A working proposal

The workshop did not resolve all the complexities related to the definition of drug resistance mutations for the purposes of epidemiologic surveillance. However, as a working proposal, participants agreed that it would be important to

- publish the list of mutations used in Canadian surveillance programs and reports;
- confer with international partners on the lists of mutations used in their surveillance programs and reports.

This would allow, at a minimum, comparison of data and could contribute towards an eventual consensus on the mutations to be included in drug resistance surveillance.

In addition, participants agreed that the process of identifying drug resistance mutations to be used in epidemiologic surveillance would have to be an ongoing process, incorporating mutations that are newly identified in research and in clinical practice.

Clinical and Policy Perspectives on HIV Drug Resistance Testing

Clinical Perspectives

Dr. Andrew Badley, Division of Infectious Diseases, Ottawa Hospital; Dr. Bill Cameron, Division of Infectious Diseases, Ottawa Hospital; Dr. Dan Gregson, Infectious Diseases, Calgary Laboratory Services

The clinical specialists agreed that drug resistance testing is currently of limited value in clinical care. In the event of treatment failure, the clinical characteristics of the individual and the current literature on available therapy are more important and useful than drug resistance testing. If primary drug resistance (transmission of drug-resistant virus) becomes more prevalent, clinicians may begin to request genotypic testing for patients who have been newly diagnosed with HIV, in order to determine what anti-retroviral treatments to prescribe. In that eventuality, it would be helpful to know which mutations prevalent in a region confer clinical drug resistance. This should be an area for further research.

Drug resistance testing is also of limited value in cases of occupational exposure to HIV. Post-exposure prophylaxis, if indicated, should begin immediately. The treatment history (including any history of drug resistance or drug resistance testing) of the source person can help to select or modify the regimen of drugs used for post-exposure prophylaxis should the source person be known and be found to be HIV-positive. Rigid application of post-exposure protocols can prevent any necessary adjustments in light of evidence of drug resistance in the source person or in the local population.

There is a need for a definition of viral fitness that is more useful in clinical settings. It was suggested that, from a clinical point of view, pathogenetic fitness (resulting in a loss of CD4+ cells) is more relevant than replicative fitness (resulting in an increase in viral load).

14 Policy Perspective

David Hoe, HIV/AIDS Policy, Coordination and Programs Division, Health Canada

From a policy perspective, one can assume that the prevalence of drug resistance is likely to increase over time and that primary drug resistance is likely to persist over time. This raises several policy issues:

1. What are the implications of increasing prevalence of drug-resistant virus for the economic burden of the epidemic? It is likely to increase the complexity and cost of care.
2. How should the prevalence of drug resistance and primary drug resistance be integrated into the public health response to the HIV epidemic? Prevention of drug resistance and primary drug resistance is clearly essential, and people in the community have a right to know that drug-resistant virus is prevalent. The concepts of drug-resistant virus and its impact on treatment need to be integrated into public health and community educational and prevention efforts.
3. How can we ensure equity of access to resistance testing and related care as we change our response to the epidemic? Access may be affected by geographic factors: resistance testing takes place largely in metropolitan areas of Canada, such that rural people may be underserved. Access may be affected by cost: Will all jurisdictions cover the costs of drug resistance testing (it was noted that in British Columbia and Quebec resistance testing is covered by provincial health insurance plans). Access may be affected by other socioeconomic characteristics: the divides already observed in the HIV epidemic in relation to technology, knowledge, and justice may appear with respect to drug resistance as well.
4. Finally, collaboration between federal and provincial/territorial governments and national standardization of drug resistance testing will be important in the long-term development of policy and programs.

In the discussion that followed this presentation, participants noted that there are gaps in the ability of family physicians to interpret the results of resistance testing. This points to a need for policy and programming related to continuing medical education and the "neural networks" required for clinicians to remain abreast of developments in epidemiology, technology, and treatment.

Summary

Dr. Chris Archibald summarized the day's proceedings at the conclusion of the workshop. He noted the following:

- Important questions remain to be answered about the significance of drug resistance mutations and the transmission of drug-resistant virus.
- The ground is constantly shifting in this area, as knowledge about existing and new mutations emerges. It is necessary to remain abreast of the latest research findings.
- Drug-resistant virus acquired through transmission (primary drug resistance) appears to be remarkably stable over time in the absence of anti-retroviral therapy, according to data from Quebec (Primary Infection Study) and Ontario (Polaris Study). The implications of these data need to be explored further.
- Interpretation of resistance data needs to be correlated with clinical utility. The identification of clinically relevant mutations will be an ongoing task for research.
- The determination of which mutations to include in a drug resistance surveillance program is crucial. Whatever the outcome of deliberations in Canada and internationally, the list will have to be continually updated, as knowledge of drug resistance evolves. For the present, it appears that the list should include, as a minimum, primary mutations and selected secondary mutations.
- Comparability of drug resistance surveillance data is highly desirable, both within Canada and with international collaborators.
- Quality control is very important in drug resistance testing and needs to be implemented.

As a next step in the development of drug resistance surveillance in Canada, participants agreed that

- the CIDPC, together with its partners, regularly publish the list of mutations it is including in its surveillance of drug resistance;
- the CIDPC continue to consult with its national and international partners on the definition and identification of mutations for the purpose of drug resistance surveillance, with a view to arriving at a consensus on the mutations to be tracked.

Appendix A: List of Invited Participants

Alberta

Dr. Dan Gregson
Medical Microbiologist
Infectious Diseases
Calgary Laboratory Services
1638 -10th Ave SW
Calgary, AB T3C 0J5

Tel: (403) 209-5309
Fax: (403) 209-5347

Ms Linda Chui
Laboratory Scientist and Program
Leader of the Molecular Program
University of Alberta Hospital
Microbiology and Public Health
Laboratory
Walter McKenzie Centre
Room 1B2.18
University of Alberta Hospital
8440-112th Street
Edmonton, AB T6G 2J2

Tel: (780)
Fax: (780) 407-8984
E-mail: L.Chui@provlab.ab.ca

British Columbia

Mr. Rick Galli
Coordinator, HIV Resistance Testing
BC Centre for Excellence in HIV/AIDS
613-1081 Burrard St.
Vancouver, BC V6Z 1Y6

Tel: (604) 806-9145
Fax: (604) 806-8464
E-mail: rgalli@hivnet.ubc.ca

Mr. Darrel Cook
Manager, Laboratory Services
BC Centre for Disease Control
655 West 12th Avenue
Vancouver, BC V5Z 4R4

Tel: (604) 660-6045
Fax: (604) 660-6073
E-mail: darrel.cook@bccdc.ca

Manitoba

Dr. Magdy Dawood
Director of Laboratory and Imaging
Services Branch
Cadham Provincial Laboratory
P. O. Box 8450
1750 William Avenue
Winnipeg, MB R3C 3Y1

Tel (204) 945-7545
Fax (204) 786-4770
E-mail: MDawood@gov.mb.ca

Ontario

Dr. Bill Cameron
Ottawa Hospital
General Campus
Division of Infectious Disease
501 Smyth Road., Rm. G12
Ottawa, ON K1H 8L6

Tel: (613) 737-8880
Fax: (613) 737-8925
E-mail: bcameron@ottawahospital.on.ca

Dr. Andrew Badley
Assistant Professor, Division of
Infectious Diseases
Ottawa Hospital, General Campus
501 Smyth Road
Ottawa, ON K1H-8L6

Tel: (613) 737-8998
Fax: (613) 737-8682
E-mail: abadley@ohri.ca

Quebec

Mme Micheline Fauvel
Directrice adjointe
Laboratoire de santé publique du Québec
20045, chemin Sainte-Marie
Sainte-Anne-de-Bellevue, QC H9X 3R5

Tél : (514) 457-2070
Téléc : (514) 457-6346
Courriel : mfauvel@lspq.org

Hughes Charest
Biologiste moléculaire
Laboratoire de santé publique du Québec
20045, chemin Sainte-Marie
Sainte-Anne-de-Bellevue, QC H9X 3R5

Tél : (514) 457-2070 poste 239
Téléc : (514) 457-7292
Courriel : hcharest@lspq.org

Dr. Bruno Turmel
Médecin conseil
Responsable du programme de
surveillance du sida au Québec
Direction générale de la santé publique
Ministère de la Santé et des Services
sociaux
201, boulevard Crémazie est
Bureau 2.03
Montréal, QC H2M 1L2

Tél. : (514) 873-1264
Téléc : (514) 864-2778
Courriel : bruno.turmel@msss.gouv.qc.ca

Dr. Bluma Brenner
Coordinator of Drug Resistance Testing
McGill AIDS Centre, Room 326
Lady Davis Institute
3755 Côte Ste-Catherine
Montreal, QC H3T 1E2

Tel: (514) 340-8260 ext5261
Fax: (514) 340-7537
E-mail: bluma.brenner@mcgill.ca

Ms Bonnie Spira
Manager of HIV Laboratories
McGill Aids Centre
Lady Davis Institute
Jewish General Hospital
3755 Côte St Catherine
Montreal, QC H3T 1E2

Tel : (514) 340 8260ext 5302
Fax : (514) 340 7537
E-mail: bonnie.spira@mcgill.ca

Saskatchewan

Dr. Edward Chan
Clinical Director
Provincial Laboratory
Saskatchewan Health
3211 Albert Street
Regina, SK S4P 5W6

Tel: (306) 787-3135
Fax: (306) 787-1525
E-mail: echan@health.gov.sk.ca

Health Canada

Dr. Donald Sutherland
Director
Bureau of HIV/AIDS, STD and TB
Brooke Claxton Building
Tunney's Pasture, AL 0900B1
Ottawa, ON K1A 0L2

Tel: (613) 957-1777
Fax: (613) 946-0244
E-mail: don_sutherland@hc-sc.gc.ca

Dr. Paul Sandstrom
Associate Director
National HIV/AIDS Laboratories
Building #6, Room 3252
Tunney's Pasture, AL 0603B3
Ottawa, ON K1A 0L2

Tel: (613) 957-0172
Fax: (613) 957-7258
E-mail: paul_sandstrom@hc-sc.gc.ca

Dr. Chris Archibald
Chief, Division of HIV/AIDS
Epidemiology and Surveillance
Bureau of HIV/AIDS, STD and TB
Brooke Claxton Building
Room 0108B
Tunney's Pasture, AL 0900B1
Ottawa, ON K1A 0L2

Tel: (613) 941-3155
Fax: (613) 946-8695
E-mail: chris_archibald@hc-sc.gc.ca

Mr. Tim Gleeson
Biologist
National Laboratory for HIV Genetics
Bureau of HIV/AIDS, STD and TB
Building #6, 3rd floor
Tunney's Pasture, AL 0603A1
Ottawa, ON K1A 0L2

Tel: (613) 952-9778
Fax: (613) 957-1163
E-mail: tim_gleeson@hc-sc.gc.ca

Dr. Gayatri Jayaraman
Senior Epidemiologist
3030 Hospital Dr. NW
Calgary, AB T2N 4W4

Tel: (403) 944-2493
Fax: (613) 283-0142
E-mail: gayatri_jayaraman@hc-sc.gc.ca

Mr. Richard Pilon
Research Technologist
Bureau of HIV/AIDS, STD and TB
Building #6, Room 3170
Tunney's Pasture, AL 0603B3
Ottawa, ON K1A 0L2

Tel: (613) 954-1278
Fax: (613) 957-1163
E-mail: richard_pilon@hc-sc.gc.ca

Dr. Tig Shafto
Senior Surveillance Officer
Division of Retrovirus Surveillance
Bureau of HIV/AIDS, STD and TB
Brooke Claxton Building.
Room 0108B
Tunney's Pasture, AL 0900B1
Ottawa, ON K1A 0L2

Tel: (613) 941-2147
Fax: (613) 957-2842
E-mail: tig_shafto@hc-sc.gc.ca

Mr. Bruce Tudin
Surveillance Officer
Division of HIV/AIDS Epidemiology and Surveillance
Bureau of HIV/AIDS, STD and TB
Brooke Claxton Building
Room 0108B
Tunney's Pasture AL 0900B1
Ottawa, ON K1A 0L2

Tel: (613) 954-5168
Fax: (613) 946-8695
E-mail: bruce_tudin@hc-sc.gc.ca

Mr. David Hoe
Manager
Policy Development Unit
HIV/AIDS Policy, Coordination and Programs Division
Jeanne Mance Building, 18th floor
Tunney's Pasture, AL 1918B1
Ottawa, ON K1A 0K9

Tel: (613) 954-1008
Fax: (613) 952-3556
E-mail: david_hoe@hc-sc.gc.ca

Dr. Brian Foster
Senior Science Advisor
Bureau of Policy and Coordination
Healthy Products and Food Branch
Holland Cross Building
Tower B, Room 2092
Tunney's Pasture, AL 3102C3
Ottawa, ON K1A 1B6

Tel: (613) 957-3506
Fax: (613) 941-5035
E-mail: brian_foster@hc-sc.gc.ca

Ms Marilyn Davis
Scientific Support
Office of Science, Bureau of Policy and Coordination
Therapeutic Products Directorate
Holland Cross
Tower B, Room 2089
1600 Scott Street
Ottawa, ON K1A 1B6

Tel: (613) 951-6260
Fax: (613) 941-5035
E-mail: marilyn_davis@hc-sc.gc.ca

Community Representative

Ms Jessica Daniels
National Programs Consultant
Canadian AIDS Society
4th floor, 309 Cooper Street
Ottawa, ON K2P 0G5

Tel: (613) 230-3580 ext. 141
Fax: (613) 563-4998
E-mail: jessicad@cdnaids.ca

International Guest

Dr. Rob Schuurman
Molecular Virologist
University Medical Center Utrecht
Department of Virology (G04-615)
Heidelberglaan 100
3584 CX Utrecht
The Netherlands

Tel: +31 30 250 6526
Fax: +31 30 250 5426
E-mail: rob.schuurman@lab.azu.nl

Meeting Recorders

Mr. Sean Hosein
21 Westmoreland Avenue
Toronto, ON M6H 2Z6

Tel: (416) 516-9929
E-mail: srhosein@sympatico.ca

Dr. Theodore de Bruyn
408 Riverdale Avenue
Ottawa, ON K1S 1S2

Tel: (613) 730-7841
Fax: (613) 730-0782
E-mail: tdebruyn@cyberus.ca

Appendix B: Presentations

Surveillance of Primary Drug Resistance

1 Prevalence and Determinants of Primary Drug Resistance in Canada

Dr. Gaya Jayaraman, Centre for Infectious Disease Prevention and Control, Health Canada

Slide 1

Prevalence and determinants of primary drug resistance in Canada

Gaya Jayaraman
Centre for Infectious Disease Prevention and Control
Health Canada

HIV Drug Resistance Workshop
March 21, 2002

Centre for Infectious Disease Prevention and Control

Slide 2

Canadian HIV Strain and Drug Resistance Surveillance Program Partners

Centre for Infectious Disease Prevention and Control

Slide 3

Canadian HIV Strain and Drug Resistance Surveillance Program Partners

- Centre for Infectious Disease Prevention and Control, Health Canada
- BC Centre for Disease Control
- Alberta Health and Wellness, Provincial Laboratory for Public Health, University of Alberta and University of Calgary
- Saskatchewan Health
- Manitoba Health
- Ontario Public Health Laboratory
- Newfoundland Public Health Laboratory, Department of Health and Community Services

Centre for Infectious Disease Prevention and Control

Slide 4

Goals of CHSDRSP

To assess genetic markers for primary anti-retroviral drug resistance

Primary drug resistance: increased resistance to anti-retroviral drugs seen in individuals who have never before been on treatment, so presumably, these individuals have been infected with drug-resistant virus

Secondary drug resistance: increased resistance to drug seen among individuals already on treatment (presumably due to treatment failure)

Centre for Infectious Disease Prevention and Control

Slide 5

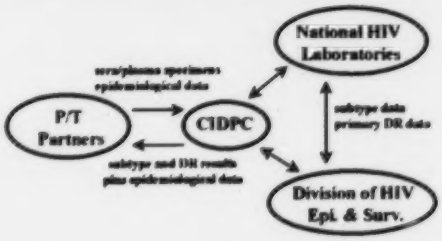
Public health implications of population-bases surveillance on primary drug resistance

- Track prevalence of primary DR to develop population recommendations for initial therapy (especially for pregnant women and for use in PEP)
- Use transmission of DR strains of HIV as an indicator to evaluate prevention programs and guide policy

Centre for Infectious Disease Prevention and Control

Slide 6

Data collection, analysis and transfer



Centre for Infectious Disease Prevention and Control

Slide 7

pol sequence analysis

- Align sequence and compare to early wild type virus HXB2 (prior to ART)
- Identify mutations using consensus of Stanford and LANL HIV drug resistance databases

"Primary" mutation: mutation in viral sequence, that in and of itself is strongly associated with drug resistance

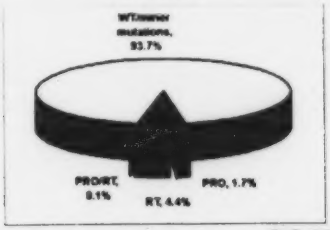
"Secondary" mutation: mutation in viral sequence, that, in combination with other mutations is associated with drug resistance

Centre for Infectious Disease Prevention and Control

Slide 8

HIV-1 primary drug resistance

(N = 706)



Centre for Infectious Disease Prevention and Control

Slide 9

Primary mutations in RT

Antiretroviral Drug	# Individuals (%) N=706	Primary Mutations
RTI, Total	31 (4.4)	
AZT	14 (2)	M41L
AZT	1 (0.1)	K70R
ddC	3 (0.4)	T69D/N
AZT/ddC	1 (0.1)	M41L/T69N
AZT/ddC	1 (0.1)	K70R/T69N
Adefovir	1 (0.1)	K70E
3TC/Abacavir/Adefovir	4 (0.6)	M184V
AZT/3TC/Abacavir/Adefovir	1 (0.1)	M184V/T215Y
Foscarnet	1 (0.1)	H208Y
DLV, NVP, EFV	1 (0.1)	K103N
DLV, NVP, EFV, NRTI, FTC	2 (0.3)	K103N/Q151M
NVP	1 (0.1)	G190A/E/S

Centre for Infectious Disease Prevention and Control

Slide 10

Primary mutations in PRO

Antiretroviral Drug	# Individuals (%) N=706	Primary Mutations
PI, Total	12 (1.7)	
Ritonavir	5 (0.7)	M46I
Amprenavir	1 (0.1)	I50V
Indinavir/Ritonavir	1 (0.1)	V82A
Nelfinavir	2 (0.3)	N88D
Nelfinavir	3 (0.4)	L90M

Centre for Infectious Disease Prevention and Control

Slide 11

Characteristics of individuals harbouring primary mutations

- Adults of both genders
- Ages 16 to 69 years (majority between 15 39 years)
- Primary risk factors = male-to-male sex, injection drug use, heterosexual contact
- Across most ethnicities (White, Black, Asian, Aboriginal persons)
- Infection with HIV-1 subtypes A, B, C
- Prevalence likely increasing over time
- Identified across Canada (BC, AB, SK, MB, ON, QC)

Centre for Infectious Disease Prevention and Control

Slide 12

Preliminary conclusions: HIV-1 primary drug resistance

- Evidence of primary DR to RTIs and PIs
- Combined RTI/PI resistant virus has been identified in at least one treatment-naive individual
- Prevalence of HIV-1 with primary DR mutations is 6.3% (RTIs, 4.4%; PIs, 1.7%; RTI/PI, 0.1%)
- Primary DR mutations were identified across different ages, risk exposures, ethnicities, and in non-B HIV-1 subtypes, provinces

Centre of Infectious Disease Prevention and Control

Slide 13

Issues to consider

- Unresolved technical issues in DR testing remain
  - sample quality
  - ability to identify mutations in minority subspecies
  - ability to identify mutations in non-B subtypes
  - which mutations "count"?
  - lack of standardisation
  - clinical and/or public health relevance
- Gaps in epidemiological data (risk factors, ethnicity, year first positive, treatment history)
- Data represent only those that are infected and tested and with "stable" mutation

Centre for Infectious Disease Prevention and Control

Slide 14

Future directions

- Collect sera and epidemiological information on ALL newly diagnosed cases of HIV in order to enhance representativeness
- Use incidence testing to monitor trends in "recent" infections
- Population-based phylogenetic analysis to assess transmission patterns
- Expand to include remaining provinces and territories
- Liaise with national stakeholders to influence prevention and treatment programs and policies
- Partner with other international organisations to monitor trends globally

Centre for Infectious Disease Prevention and Control

Slide 15

Mutations associated with high level DR (as of December, 2001)

- Draft list of Protease Inhibitors

CHSDRSP	Stanford DB	IAS - USA	ART
D30N	yes	yes	NFV
M46I/L	yes	yes	INV
I47V	no	no	APV
G48V	yes	yes	SQV
I50V	yes	yes	APV
V82A/F/S/T	yes	yes	IDV, RTV
I84V	yes	yes	APV, IDV, RTV
N88D	no	no	NFV
L90M	yes	yes	NFV, SQV

Slide 16

Mutations associated with high level DR (as of December, 2001)

- Draft list of Nucleoside RT Inhibitors:

CHSDRSP	Stanford DB	IAS - USA	ART
M41L	yes	yes	AZT
A62V	no	no	d4T
K65R	yes	yes	ddC, ddI, TDF, Abacavir
D67N	yes	no	AZT
T69D	yes	no	ddC
K70R	yes	no	AZT
K74V	yes	yes	ddI, ddC, Abacavir
V75T	no	yes	d4T, ddI
Q151M	no	no	AZT, ddC, ddI, d4T, 3TC, Abacavir
M184V/I	yes	yes	3TC, ddC, ddI, Abacavir
L210W	yes	no	AZT, d4T, Abacavir
T215F/Y	yes	yes	AZT, d4T, Abacavir
T219Q/E	yes	no	AZT, d4T, Abacavir

Slide 17

Mutations associated with high level DR (as of December, 2001)

- Draft list of Non-nucleoside RT Inhibitors:

CHSDRSP	Stanford DB	IAS - USA	ART
L100I	yes	yes	DLV, EFV
K103T	no	no	DLV
K103N	yes	yes	DLV, NVP, EFV
V106A	yes	yes	NVP
V106I	yes	no	NVP, EFV
Y181C/I	yes	no	DLV, NVP, EFV
Y188C/L/G	yes	no	NVP, EFV
G190S/A	yes	no	NVP, EFV
P225H	yes	no	EFV
M230L	yes	yes	DLV, NVP
P236L	yes	yes	DLV

Slide 18

What about "revertants?"

Ex: T215D/C

- located at the site of mutations associated with high level of resistance to ART (T215Y/F)
- susceptible to drug (A/T), replicate efficiently
- result of partial reversion to WT in the absence of selective pressure: Y→ D/C → T

PH clinical implications:

- result of infection with drug resistant strain carrying mutation associated with high level of resistance to ART
- may compromise the efficacy of ART

British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS: Recent Trends and Challenges in HIV Drug Resistance Testing

Mr. Rick Galli, British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS

Slide 1

Recent Trends and Challenges in HIV Drug Resistance Testing

British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS

Rick Galli

Slide 2

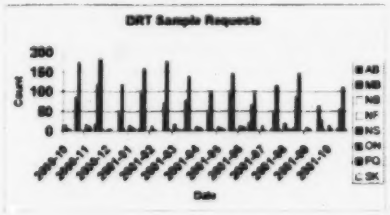
Centre for Excellence
HIV DRT Program Background

- CfE began sequence-based genotyping methods development in 1997.
- Collaboration with Virco for access to VirtualPhenotype database.
- Operational as BC clinical service since April 1999.
- First in Canada to offer DRT as a clinical service: May 1999 extended offer to other provinces.
- To date, ~8,500 tests (1,500 patients) from BC; 7,000 tests from ROC.

Slide 3

DRT Requests, ROC

- Since 01-02, testing for Ontario, Manitoba, Southern Alberta, Nova Scotia, New Brunswick.



Slide 4

Temporal Trends in HIV Drug Resistance in BC

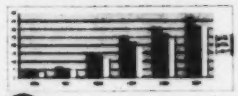
Slide 5

NRTI Trends

Abacavir resistance higher in 96/97 yet not in general use until 1999 (Cross resistance)

PI Trends

Nelfinavir resistance remains consistently higher than the rest due to increased prevalence of D30N mutation



NNRTI Trends

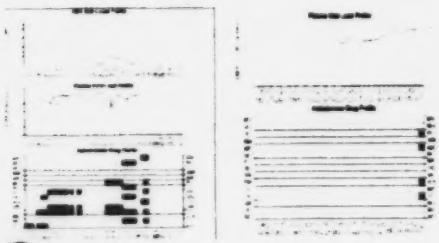
Increased prevalence over time of K103N mutation which by itself causes broad NNRTI class resistance

Slide 6

Primary Resistance

Slide 7

Primary Resistance Case Study



Slide 8

Persistance of PR and RT Mutations in the Absence of Therapy

Date	PR Mutations	RT Mutations	Date	PR Mutations	RT Mutations
Baseline positive Jun/96 to Dec/97	36I, 63P, 71V, 90M	41L, 44D, 70M, 90G, 184V, 210W, 211K, 215Y		Not tested	Not tested
Apr/99	10I, 20R, 36I, 63P, 71V, 82A, 90M	41L, 44D, 70M, 90G, 184V, 210W, 211K, 215Y	Jun/99	10I, 20R, 36I, 63P, 71V, 82A, 90M	41L, 44D, 70M, 90G, 184V, 210W, 211K, 215Y
Oct/99	10I, 20R, 36I, 63P, 71V, 82A, 90M	41L, 44D, 70M, 90G, 98G, 101E, 184V, 210W, 211K, 215Y	Oct/99 to March/01	10I, 20R, 36I, 63P, 71V, 82A, 90M	41L, 44D, 70M, 90G, 210W, 211K, 215Y

Slide 9

Prevalence and Clinical Implications of Insertions in the HIV p6^{Gag} N-Terminal Region in Drug Naive Individuals Initiating Antiretroviral Therapy

- p6^{Gag} insertions seen in up to 21% of patients treated with NRTI's, but only 5% in drug naive (Peters et al J Virol, 2001)
- Associated with increased infectivity and development of resistance
- Increased p6^{Gag} frequency in primary infection coincided with increased incidence of infection with drug resistant HIV (Smith et al, CROI 2002)

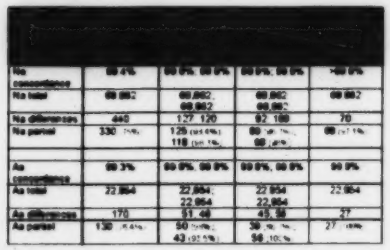
- In BC naive cohort, n=431, p6^{Gag} prevalence is 14.8%
- Significantly associated with higher pVL and lower CD4 cell count at baseline.
- Not associated with baseline antiretroviral resistance

Slide 10

Variability of Sequence-Based HIV Drug Resistance Testing

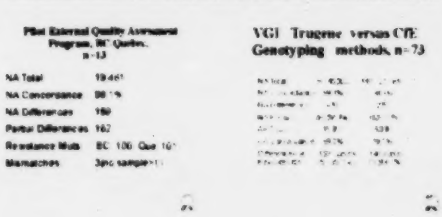
Slide 11

Variability of "In-House" HIV Drug Resistance Testing



Slide 12

Site-to-site Variation: Methods Comparison

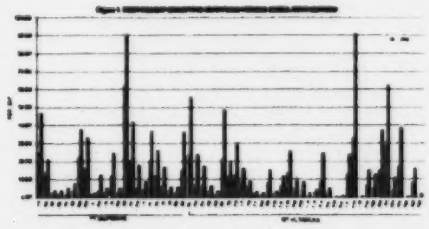


Slide 13

Clinical Implications of HIV Drug Resistance Testing

Slide 14

Reversion of Resistance Mutations



Slide 15

Challenges in Standardization of Drug Resistance for Surveillance

- "16 choose 3" combinations of therapy.
- >240 mutations associated with resistance.
- Reversion of mutations over time.
- Rules based vs VirtualPhenotype.
- Adherence

When stratified into categories, the data is too sparse to indicate trends or significance.

Slide 16

"Resistance with Response" Collaborative Data Initiatives

- RDI - Toronto
- Forum for Collaborative Research - Washington DC

Anyone with resistance data coupled to response to treatment data can contribute.

Polaris Study: Transmission of Drug-Resistant HIV-1 in Ontario

Mr. Richard Pilon, Centre for Infectious Disease Prevention and Control, Health Canada, on behalf of the Polaris Study group.

Slide 1

POLARIS

Transmission of Drug Resistant HIV-1 in Ontario

Richard Pilon
Paul Sandstrom
And the Polaris Study Group

Slide 2

Polaris Study

The Polaris Study is a 5-year observational Study of a well defined cohort of individuals who have recently become infected with HIV.

Slide 3

Goals of Polaris

- Determine why/how patients become infected (social, epidemiological).
- Characterize the infecting virus.
- Determine rate of transmission of Drug Resistant HIV in Ontario.
- Monitor changes in Drug Resistance over time.
- Correlate findings with disease progression.

Slide 4

Patient Enrollment

- Centralized testing performed at the Ontario Central Public Health Laboratory.
- 1000 new infections each year in Ontario.
- Many among individuals who previously tested negative.

Slide 5

Criteria for Enrollment

- Tested HIV-positive within 12 months, and negative within 2 years of the first positive.

or

- Indeterminate HIV test result followed by a positive test result within 12 months.

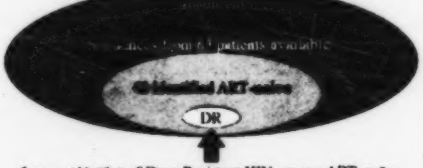
Slide 6

The Polaris Cohort

- Patients go through an extensive enrollment interview to determine social and epidemiological information (risk, why test, symptoms).
- Plasma specimens and clinical data are collected at baseline and every 6 months for 5 years.
- Since 1998, more than 100 patients enrolled; less than 5% per year have left the study.

Slide 7

Results



5 cases (11.6%) of Drug Resistant HIV among ART-naive.
All to reverse transcriptase inhibitors (RTI).
No resistance to protease inhibitors (PI).

Slide 8

Transmitted DR Mutations Among ART-naïve Individuals

Patient	Time from Diagnosis	RT Mutations		Resistance
		[illegible]	[illegible]	
T 02	14 months	[illegible]	[illegible]	Low-level to all NNRTI
T 30	2 months	[illegible]	[illegible]	High-level DLV/NVP, low -level EFV
T 03	12 months	[illegible]	[illegible]	?Low-level to all NNRTI?
T 24	5 months	[illegible]		Intermediate AZT Low-level D4T/ABC
O 06	9 months	[illegible]		Intermediate AZT Low-level D4T/ABC

Slide 9

Persistence of DR Variants

Risk Group	Patient #	Date Diagnosed	Time from Diagnosis	Viral Load (copies/mL)	CD4	[illegible]	[illegible]
MSM	T 02	21-Sep-97	[illegible]	35,[illegible]	–	[illegible]	[illegible]
			[illegible]	60,63[illegible]	–		[illegible]
			[illegible]	40,04[illegible]	–		[illegible]
			[illegible]	66,88[illegible]	–		[illegible]
			[illegible]	70,119			[illegible]
			[illegible]	[illegible]			[illegible]
MSM	T 03	19-Sep-97	[illegible]	11,700	620	[illegible]	[illegible]
			[illegible]	12,455	510		[illegible]
			[illegible]	35,142	[illegible]		[illegible]
			[illegible]	17,990	[illegible]		[illegible]
MSM	T 24	15-Feb-99	[illegible]	22,907	290	[illegible]	[illegible]
			[illegible]	17,279	307		
IDU	O 06	30-Dec-98	[illegible]	9,899	–	[illegible]	[illegible]
			[illegible]	7,[illegible]	–		

Slide 10

Fitness of Transmitted DR Variants

- V179D and V106A have been shown to have reduced replicative fitness.
- One study on M41L indicated it has wild-type fitness.

Slide 11

Conclusions

- We are seeing transmission of drug resistant HIV (11.6%).
- Transmitted DR viruses persist in the absence of ART for up to 4 years after diagnosis of HIV infection!
- More study needed on individuals infected with drug resistant HIV.

Slide 12

Acknowledgements

University of Natal
Dr Sharon Cassol

Ontario Central Public Health Labs
Carol Mayer
Carol Swantee

University of Ottawa
Michelle Jones

National Lab for HIV Genetics
Tim Gleason
Rick Barrette
Isabelle Jeannaw

Polaris Study Group
Dr Luviana Calzavara
Ann Burchell
Wendy Medved
Dr Stan Read
Dr Ken Logan
Dr Kevin Gough
Dr Anita Rachlis

Funded by grants from
NHRDP/CIHR, Health Canada and
AIDS Bureau, Ontario Ministry of
Health

4. Multi-drug Resistance in Quebec Primary HIV-1 Infection

Dr. Bluma G. Brenner, McGill AIDS Centre, McGill University

Slide 1

Multidrug-resistance in Quebec Primary HIV-1 infection

- Mark A. Wainberg
- Bluma G. Brenner
- Bonnie Spira
- Jean-Pierre Routy
- Rafick Sekaly
- Brian Conway

- Daniela Moisi
- Maureen Oliveira
- Mervi DeTorio

Slide 2

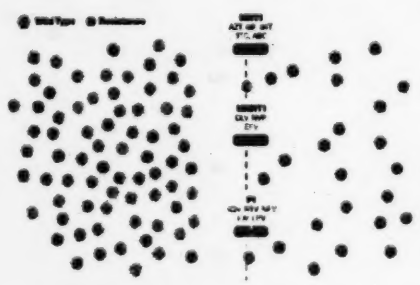
Collaborateurs- FRSQ

Slide 3

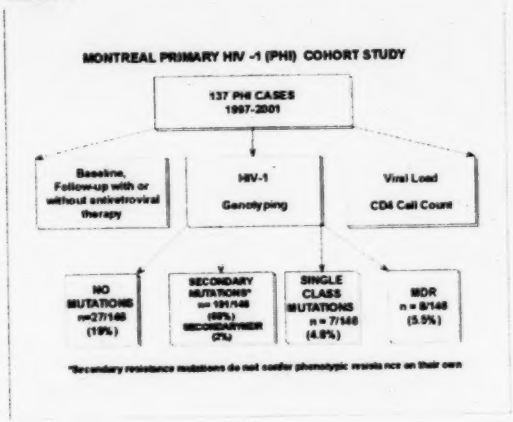
Study Objectives

- Prevalence of Drug Resistance in PHI
- Genotypic evolution of MDR Infections over time.
- Impact of MDR infection on viremia and CD4 cell count
- Viral fitness of MDR viruses relative to WT virus

Slide 4



Slide 5



Slide 6

Prévalence comparée de souches résistantes (1)

	Montréal n 146 1997-01	Geneva n=82 1996-98	New-York n=80 1995-99	California n 141 1989-98
RT Mutations	25 %	10.0%	16.3%	
MDR (Dual or Triple Class)	5.5%	1.3%	3.8%	2.1%
NRTIs	8.9%		12.5%	
A/T/TAMs - 215Y/F	4.8%	9.0%	7.5%	
3TC-184V	3.4%	2.4%	5.0%	2.1%

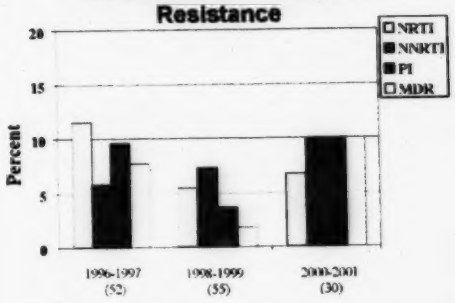
Slide 7

Prévalence comparée de souches résistantes(2)

	Montréal n=144 1997-02	Genève n=82 1996-98	New-York n=80 1995-99	Californie n=141 1989-98
Inhibiteur protéase	74%			
PI primaire 90 82,84	5.5% 2.7% 4.8%	1.4%	2.5%	--
NNRTI	4.2%	1.0%	8.8%	0.7%
103	1.4%	--	1.3%	--
Non-B	1.4%			

Slide 8

Prevalence of Phenotypic Resistance



Slide 9

TABLE 1. Transmission of MDR in primary HIV-1 infection

Patient	Codon substitutions associated with drug resistance		
	NRTI mutations	NNRTI mutations	PI mutations
1	41L; 67N; 69N; 70R; 74V; 184V; 215F, 219Q	100I; 103N	10I; 36I; 54V; 63P; 71V; 73S; 82V; 90M
2	41L; 184V; 215Y	103N, 179E	48V; 63P; 71V; 73S; 77I; 82A; 90M
3	None	103N	10I; 54V; 63P; 71V; 82T; 84V; 90M
4	184V; 215Y	103N	77I
5	184V	106I	20R, 77I
6	41L; 67N; 210W; 215Y	None	63P; 71V; 73S; 90M
7	41L; 215Y	101E	None
8	41L; 215Y	101E	None

Slide 10

MDR INFECTIONS PERSIST WITH TIME

Slide 11

Genotype of viral quasispecies over time in untreated PHI patient 2

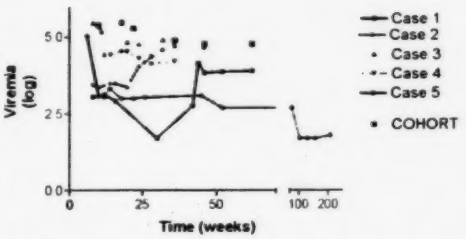
Week post-PHI	Viral source	Codon substitutions associated with drug resistance		
		NRTI mutations	NNRTI mutations	PI mutations
PHI patient 2				
8*	Plasma	41L; 184V; 215Y	103N, 179E	48V; 63P; 71V; 73S; 77I; 82A; 90M
12	Plasma	41L; 184V; 215Y	103N, 179E	48G/A; 63P; 71V; 77I; 82A; 90M
24, 28	Plasma	41L; 184V; 215Y	103N, 179E	63P; 71V; 77I; 82A; 90M
32	Plasma	41L; 184V/M; 215Y	103N, 179E	63P; 71V; 77I; 82A; 90M
36	Plasma	41L; 215Y	103N, 179E	63P; 71V; 77I; 82A; 90M
47	Plasma	41L; 215C	103N, 179E	63P; 71V; 77I; 82A; 90M
47	PBMC	41L; 215C	103N, 179E	63P; 71V; 77I; 82A; 90M
Source partner 2				
8*	Plasma	41L; 184V; 215Y	103N; 179E	48V; 63P; 71V; V77I; 73S; 82A; 90M

*designates time of first presentation

Slide 12

MDR Infections can elicit low viremia

Slide 13

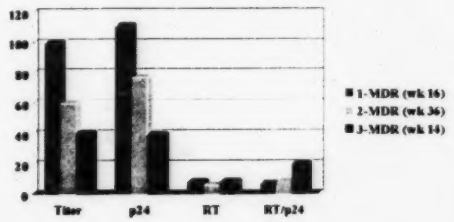


Slide 14

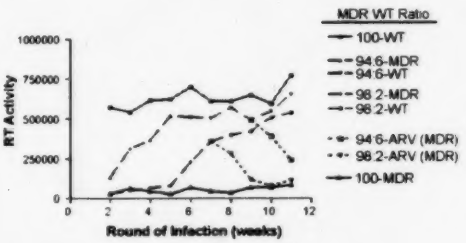
MDR Viruses Have Impaired Fitness

Slide 15

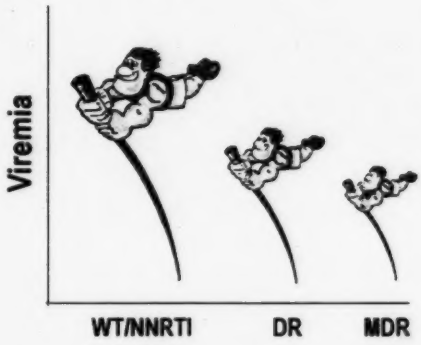
MDR Viruses have Impaired Replicative Fitness



Slide 16



Slide 17



Slide 18

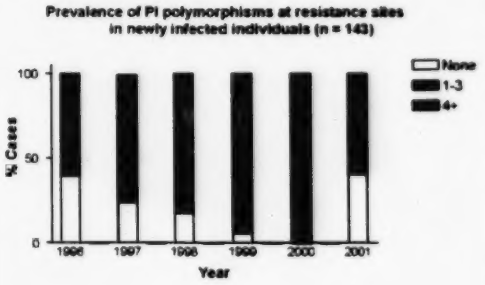
Conclusions

- 10.3% of PHI cases acquire DR infections
- 5.5% of PHI cases acquire MDR infections
- MDR infections may persist over time
- MDR infections can be associated with low viremia
- MDR infections are replicatively unfit
- Non-B clade infections are present in 7.7% of Quebec patients; 2 recent PHI cases

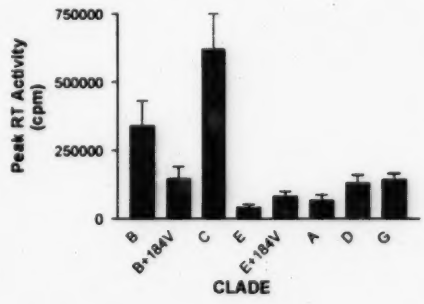
Slide 19

New Developments

Slide 20



Slide 21



The SPREAD Study

Dr. Rob Schuurman, University Medical Centre, Utrecht, The Netherlands

Slide 1

Slide 2

Introduction: transmission

- Several reports on transmission of drug resistant HIV viruses
- No standard definitions on resistance, population or testing
- Small sample sizes
- Prevalence of drug resistant viruses in the naive population is estimated to be 10 %

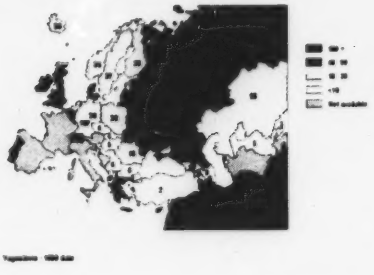
Slide 3

Introduction: transmission

- Suboptimal therapy
- After a period of good suppression by triple therapy an increase is seen of patients with detectable viraemia (Swiss Cohort study: 10% in 1996 vs. 53% in 1999)
- Increase of non-B subtypes
- Transmission of HIV is probably largely driven by PHI

Slide 4

HIV infections newly diagnosed: cases reported in 2000 per million population WHO European Region



Slide 5

Objectives I

- Establishment of a European Surveillance program
- Collection of comparable and reliable data on transmission of HIV drug resistance
- Installment of a network of reference laboratories
- Determination of the overall incidence and patterns of transmission of drug resistant HIV over time per country

Slide 6

Objectives II

- Investigation of the incidence of different HIV subtypes and the relationship with mutational resistance patterns
- Analysis of the relationship between the incidence of transmission and the nature of antiretroviral consumption and guidelines
- Development of models to predict future trends in HIV-drug resistance transmission

Slide 7

Target population

- True seroconverters
  - from epidemiological perspective most interesting
  - difficult to identify
- Newly diagnosed HIV patients
  - resistant mutations may be overgrown/revert
  - patients for who a resistance test may be of immediate interest
- Possible use of peptide based detuned assay
- Nested studies: donor - recipient

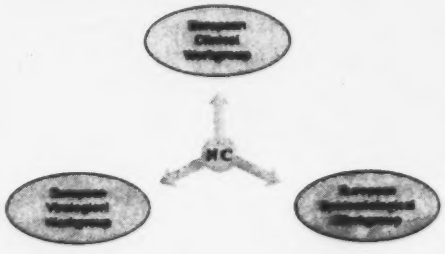
Slide 8

Definitions of target population

- True seroconverters
  - Not exposed to antiretroviral therapy
  - Negative ELISA and a positive plasma HIV-RNA or
  - Positive ELISA and intermediate Western blot
- Newly diagnosed HIV patients
  - Never exposed to antiretroviral therapy
  - Positive ELISA and a positive plasma HIV-RNA or
  - Positive ELISA and Western blot

Slide 9

National infrastructure in each country



Slide 10

Data Collection

- Clinical and behavioural data
  age,sex,area, immune status, route and date of transmission, risk factors etc
- Epidemiological data
  national HIV prevalence and incidence, geographic distribution, national treatment guidelines and antiretroviral consumption
- Virological data
  viral load, genotypic and phenotypic resistance analysis, quality control data

Slide 11

Resistance testing

- Genotypic resistance analysis
  - 4000 samples
  - protease and RT genes
  - decentralized (ENVA quality controlled)
- Phenotypic resistance analysis
  - 400 samples
  - centralized testing

Slide 12

Participants

Austria *Puchhammer Klein Vetter*
Belgium *Vandamme DeSmyter Clumeck*
Denmark *Nielsen Smith Pedersen*
Finland *Salminen Holmstrom Ristola*
Germany *Fleckenstein Paul Schmidt Harrer*
Greece *Hatzakis Paraskevis Gargalianos*
Ireland *Hall Walsh Bergin Coughlan*
Italy *Balotta Rezza Angarano*
Luxembourg *Schmit Schneider Hemmer*
Netherlands *Boucher Lange Op de Coul Schuurman Wensing*
Norway *Holm, Aavitsland Ormaasen*
Poland *Horban Stata Stanczak Pynka*
Portugal *Camacho Paixao Mansinho*
Spain *Clotet Soriano Ruiz*
Sweden *Albert Amborn Leitner Sonnerborg*
UK *Loveday Phillips Johnson*

Slide 13

Participating governmental organisations

Austria	Ministery of Health + National Reference Center Institute of Virology University of Vienna
Belgium:	AIDS Reference Lab. Rega Institute, University of Leuven
Denmark:	Statens Serum Institut (SSI), Copenhagen
Finland:	National Public Health Institute, Helsinki
Germany:	Robert Koch Institute, Berlin + National Reference Center for Retroviruses, University of Erlangen
Greece:	National Retrovirus Reference Center, Athens
Ireland:	Virus Reference Laboratory, University College Dublin
Italy:	Instituto Superiore di Sanità, Rome
Luxembourg	Laboratoire National de Santé, National Service of Infectious Diseases
Netherlands:	National Institute of Public Health (RIVM), Bilthoven National Aids Treatment Evaluation Center (NATEC), Amsterdam
Norway:	National Institute of Public Health, Oslo
Poland:	State Institute of Hygiene, Warsaw
Portugal	National Institute of Health (INSA), Lisboa
Spain:	Service for Infectious Diseases, Instituto de Salud Carlos III
Sweden	Swedish Institute for Infectious Disease Control (SMI), Solna
UK:	Medical Research Council (MRC) *under construction*

Slide 14

What is new?

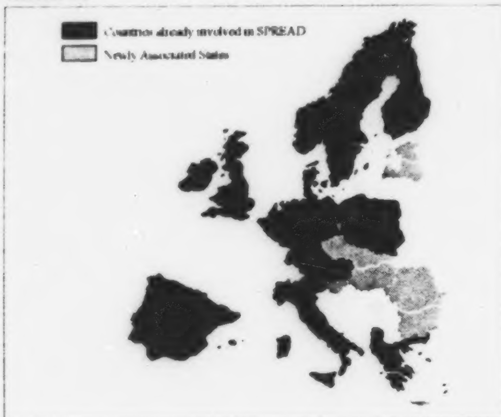
9 Newly Associated States:

- Bulgaria
- Cyprus
- Czech Republic
- Estonia
- Hungary
- Latvia
- Romania
- Slovakia
- Slovenia

3 New Workpackages:

- Viral Transmission Dynamics
- Contribution of viral fitness to spread of HIV in NAS
- Training and Twinning

Slide 15



Slide 16

Collaborations

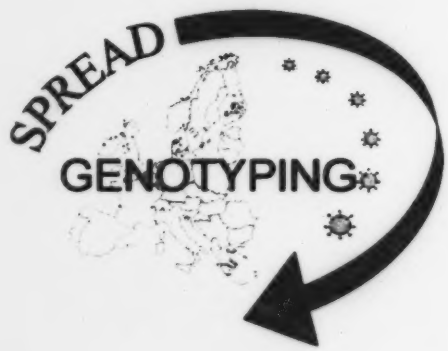
- **EuroGuidelines Group**
- **CDC**
- **Health Canada**
- **EATG**
- **WHO**
- **Other countries and organizations that already have developed experience on transmission of HIV drug resistance**

Slide 17

SPREAD-TEAM

- **Charles Boucher**
- **Annemarie Wensing**
- **Rob Schuurman**
- **Mariska Toet**

Slide 18



Slide 19

WP 3 Installation and maintenance of a quality controlled network

Objectives

- Validation of genotypic performance of all participating laboratories at the start of the project
- Monitoring of inter-laboratory consistency of sequencing results and interpretation for mutations in the HIV-1 RT and protease gene
- Monitoring of intra-laboratory variation in genotyping performance
- Evaluation of the relative sensitivity and discriminatory capacities of laboratories for the detection of mixed genotypes

Slide 20

WP 3 Installation and maintenance of a quality controlled network

Deliverables

- Report on validation and performance criteria and performance reports on a 12 monthly basis
- Publication of total analysis report in peer reviewed journal (end of the study)

Milestones

- Instalment of a quality network of HIV-reference laboratories (month 7)

Slide 21

WP 3 Installation and maintenance of a quality controlled network

Approach:

- Laboratory validation at the start of SPREAD (early 2002)
- Yearly proficiency testing of labs (early 2003 and 2004)
- Regular performance monitoring

Slide 22

WP 3 Installation and maintenance of a quality controlled network

Specifications validation panel:

- 5 samples (pure type and mixtures)
- Mutants with multiple muts in RT and PR (NRTI, NNRTI, PI)
- Sequences derived from clinical samples
- Defined mixtures in normal human plasma (citrate or EDTA)
- Non-infectious
- Stable at ambient temperature
- Viral load 5.000 copies/ml
- DNA content <5%
- Volume 1 ml
- Available early 200

Slide 23

WP 3 Installation and maintenance of a quality controlled network

Validation criteria:

- Correct detection of all homogenic mutations relative to WT in a complete mutant sample
- Detection a 50% wt/mutant mixture at more than 75% of all heterogenic position

Slide 24

WP 3 Installation and maintenance of a quality controlled network

Specifications proficiency panels:

- 5 samples, composition similar to validation panel, state of the art for resistance and subtypes
- Mutants with multiple muts in RT and PR (NRTI, NNRTI, PI)
- Sequences derived from clinical samples
- Defined mixtures in normal human plasma (citrate or EDTA)
- Non-infectious
- Stable at ambient temperature
- Viral load 5.000 copies/ml
- DNA content <5%
- Volume 1 ml
- Available early 2003 and 2004

Slide 25

WP 3 Installation and maintenance of a quality controlled network

Regular performance monitoring (month 6 each yr):

- Two samples: 1 Mutant (M) and 1 50% WT/MT mixture
- Multiple mutations in RT and protease (NRTI, NNRTI, PI)
- Sequences derived from clinical samples
- Defined mixtures in normal human plasma (citrate or EDTA)
- Non-infectious
- Stable at ambient temperature
- Viral load 5.000 copies/ml
- DNA content <5%
- Volume 1 ml

Slide 26

WP 3 Installation and maintenance of a quality controlled network

Collection of clinical samples:

- RNA analysis:
  - 10 ml EDTA plasma, aliquoted into $\geq$ 3 vials and stored at -70^{0}C (GT, PT, VL, etc)
    - Longitudinal sampling to study mutation reversion
    - Outcome study for success of treatment
- DNA analysis:
  - 3x 500ul whole blood (EDTA), stored at -70^{0}C (GT)
    - mutational archive
    - Q: higher prevalence of resistance mutations
    - substudy

Laboratory Methods Available for Analysis of Drug Resistance For Surveillance Purposes

E Current Technologies for Drug Resistance Identification

Mr. Tim Gleeson, National Laboratory for HIV Genetics, Centre for Infectious Disease Prevention and Control, Health Canada

Slide 1

Current Technologies for DR Identification

National Laboratory for HIV Genetics

Tim Gleeson
Rick Hamelin
Isabelle Joncas

Slide 2

Methodologies

Prediction and Identification of Drug Resistance

- Phenotypic
  - Characterize the ultimate biological characteristics of an organism in a given environment
- Genotypic
  - Address the genetic markers of a given biological characteristic or phenotype

Slide 3

Phenotypic Assays

- Drug resistance assays well understood
  - Analogy to phenotypic testing of antibiotics on bacteria
  - Given concentration of an inhibitory agent, what amount of growth vs WT
- Measure of drug inhibition is done *in vitro*
- Direct measure of resistance

Slide 4

Commercial Phenotyping Assays

- Two companies have developed standardized assays
  - Virco *and* Virologic
- Assays are amenable to high-throughput
- Generate a recombinant virus
  - Protease, most of RT and part of *gag* into a *pol*-deleted recombinant virus construct
  - Standardize virus inoculum infects a cell line and measure replication (IC 50)

Slide 5

Phenotypic Assay Drawbacks

- **Time**
  - HIV phenotyping varies between 2 to 6 weeks
  - Limiting usefulness of data in clinical management settings
- **Cost**
  - Labour costs for culturing and facilities
- **Real time evolution of HIV**
  - Under drug pressures virus may evolve becoming resistant
    - Artifact of the process
- **Antiviral activities of NRTI's vary between *in vitro* and *in vivo***
- **Recombinant viruses may not be optimal**
  - PI resistance modulated by mutations at *gag-pol* cleavage sites
  - 4 protease cleavage sites from patient 5 from laboratory virus construct
    - May miss compensatory mutations from the patient at these 5 sites thus inaccurate drug susceptibility results

Slide 6

Genotypic Assays

- **Sequencing based assays**
  - point mutation assays
- **Relatively low cost**
- **Do not require Biosafety containment**
- **Indirect measure of drug susceptibility**
  - Prediction of resistance
    - Detect mutations as mixtures even at levels too low for phenotypic assays
    - Detect transition mutations

Slide 7

Commercial Genotyping Assays

- **Affymetrix GeneChip**
  - Hybridization sequencing (Protease and 1200 bases of RT)
- **INNO-LiPA assay (Innogenetics)**
  - Point mutation assay for specific codons
  - Performed on nitrocellulose strips
- **ABI ViroSeq and Visible Genetics Trugene**
  - Dideoxynucleotide cycle sequencing (Protease and first 960 bases of RT (ABI) or Protease and bases 120-741of RT (VGI))

Slide 8

Genotypic Assay Drawbacks

Affymetrix GeneChip

- Requires prior knowledge of expected polymorphism
  - Challenge due to the genetic variability of HIV
- Less reliable than dideoxynucleotide sequencing for detecting mutations
- Not capable to detect insertions or deletions
- Unreliable at sequencing non-B subtypes on 'B' based chip tiling

Slide 9

Genotypic Assay Drawbacks

INNO-LiPA assay (Innogenetics)

- Limited
  - Only detect a subset of drug resistance mutations
- 10% rate of uninterpretable results
  - Likely to occur with uncommon mutations at key points

Slide 10

Genotypic Assay Drawbacks

ABI ViroSeq and Visible Genetics Trugene

- Requires specialized equipment to perform the assay
  - Thermocyclers, gel casting, specific sequencers
- Limited throughput
  - Read length limitations, reactions required
- Moderate costs

Slide 11

Conclusion

- Several options are available for drug resistance
- Advantages and disadvantages
  - Phenotyping vs genotyping
  - Between available technologies

Slide 12

Current Technologies for DR Identification

National Laboratory for HIV Genetics

Tim Gleeson
Rick Barrette
Isabelle Joanisse

Evaluation of Genotypic Drug Resistance Assays

Mr. Richard Pilon, Centre for Infectious Disease Prevention and Control, Health Canada

Slide 1

Evaluation of Genotypic Drug Resistance Assays

Richard Pilon

Slide 2

Background

- Drug resistance testing is increasingly important in the treatment of HIV infection.
- Development of drug resistance leads to virologic failure.
- Information on HIV resistance genotype can improve clinical outcome (VIRADAPT).

Slide 3

Methods Available

- Sequence based
  1. Perkin-Elmer ViroSeq
  2. Visible Genetics TRUGENE™ Assay.
  3. In house sequencing methods.
- Hybridization based (LiPA)
- Phenotyping: culture, in vitro assays.

Slide 4

Objectives

1. Create a representative panel of plasma specimens from 100 HIV-1 infected patients.
   - 40 patients >3 antiretrovirals, in virologic failure, **high** viral load (>50,000).
   - 40 patients >3 antiretrovirals in virologic failure, **low** viral load (>1,000 and <10,000).
   - 10 ART-naive patients, HIV-positive at least 5 years, with **high** v.l. (>50,000).
   - 10 ART-naive patients, HIV-positive at least 5 years, with **low** v.l. (>1,000 and <10,000)

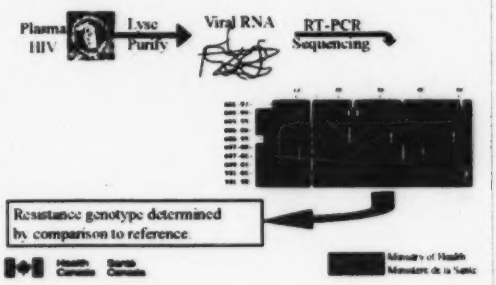
Slide 5

Objectives

2. Evaluate two commercial assays (Perkin-Elmer and Visible Genetics) in two different labs vs. in house sequencing of several clones derived from each specimen (gold standard).
3. Phenotype a subset for comparison to genotype.
4. Make use of findings to assist in the development of HIV genotypic testing programs.

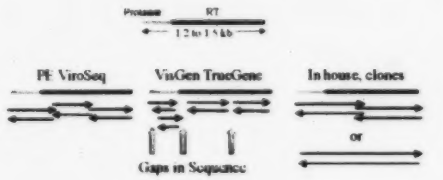
Slide 6

Resistance Genotyping



Slide 7

Sequencing Reactions



Slide 8

Genotype

Differences in assessing/presenting genotype.

- Perkin-Elmer: Lists all mutations previously shown to be related to DR, with no interpretation. Does not distinguish between primary, secondary.
- Visible Genetics: Lists relative resistance to panel of drugs, as well as the mutations and descriptions of their impact. Based on database information.

Slide 9

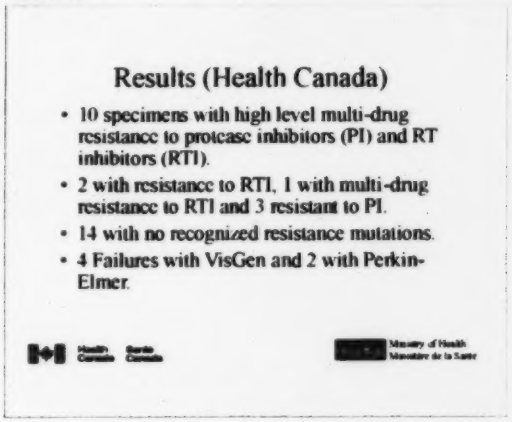
- In house method/clones: several reference based on-line resources (databases) used to assess resistance to various drugs.

Slide 10

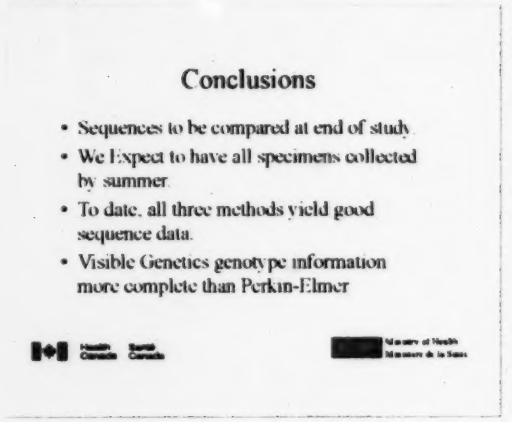
Current Status

- 32 specimens collected.
- Health Canada: VisGen and PE complete on all specimens to date.
- 6 clones each from 20 prepared.
- Labs blind to specimen info. Comparisons not yet done.

Slide 11



Slide 12



Reports from Provincial Public Health Laboratories

Alberta

Ms Linda Chui, Microbiology and Public Health Laboratory, University of Alberta Hospital

Slide 1

Perspectives from Provincial Public Health Laboratories

Linda Chui

Slide 2

Molecular Tests for HIV

1997- HIV viral load by Roche Amplicor™

1999- 2001 Genotyping performed by BC Center for Excellence in HIV/AIDS

2001- Genotyping performed in Edmonton

Slide 3

Genotyping Result

Year	# Tested	# Failed (%)
1999	49	7 (14.3)
2000	65	8 (12.3)
2001	78	7 (9.0)

Slide 4

Genotyping in Northern Alberta

2002: Trugene™ by Visible Genetics
15 specimens were included in the validation study

Slide 5

Trugene™

- Sample preparation
- Amplification
- CLIP™ bi-directional sequencing
- Analysis

Slide 6

Nucleoside RT inhibitors

- Zidovudine
- Didanosine
- Zalcitabine
- Lamivudine
- Stavudine
- Abacavir

Tenofovir
Foscarnet

Slide 7

NonNucleoside RT inhibitors

- Nevirapine
- Delavirdine
- Efavirenz

Slide 8

Protease inhibitors

- Indinavir
- Ritonavir
- Nelfinavir
- Amprenavir
- Saquinavir

Lopinavir with Ritonavir

Slide 9

Result

- 13/15: concordance
- 2/15 discordance:
  - 1: mixed infection detected by Trugene™ and resulted showed resistance but Virco showed sensitive
  - 1: failed by Virco
- Concordance result:
  - Codon 69 deletion detected by Trugene
  - 2 reported resistance by Trugene™ but reported as "likely" by Virco

Slide 10

Summary

- Ongoing validation study
- Labor intensive
- Expensive
- Data sharing?
- Standardization?
- Proficiency testing?

Standardized Approaches to Identify Mutations Significant for Drug Resistance Surveillance

Approach Used by the Centre for Infectious Disease Prevention and Control to Identify HIV Drug Resistance Mutations for Surveillance Purposes

Mr. Tim Gleeson, National Laboratory for HIV Genetics, Centre for Infectious Disease Prevention and Control, Health Canada

Slide 1

Identifying DR Mutations in the NLHG

National Laboratory for HIV Genetics

Tim Gleeson
Rick Barrette
Isabelle Joanisse

Slide 2

Canadian HIV Strain and Drug Resistance Surveillance Program (CHSDRSP)

- HIV-1 Laboratory-Based Drug Resistance Surveillance in Canada
- Archival diagnostic sera submitted by Provincial Health Laboratories (PHL)
- Epidemiological information collected
- DNA sequence drug resistance (DR) stored in integrated database
- 1053 bases of pol gene stored (full Protease and ~ 250 amino acids of Reverse Transcriptase)
- Only primary mutations reported (consensus between Stanford and Los Alamos HIV Sequence Database)

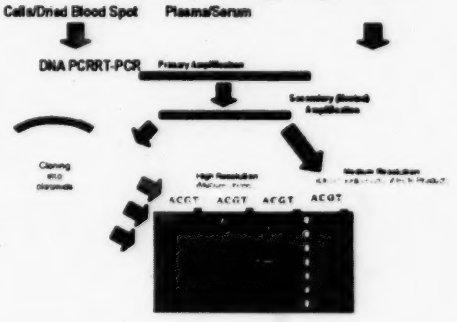
Slide 3

Laboratory CHSDRSP Targets

- To implement HIV strain surveillance as a public health tool
  - Surveys of HIV strains
  - Investigation of infection clusters
  - Monitoring the spread of HIV in specific communities
- To support Provincial Health Laboratories
  - Identification of strains in "difficult" diagnostic samples
  - Technology development and transfer
- To support international HIV strain surveillance programs
  - Development of non-sequencing based subtyping assays
  - Development of analytical software for high throughput analysis
- To support drug and vaccine trials
  - Development of genotypic and phenotypic resistance assays
  - Monitoring of strains present in Canada for vaccine trials

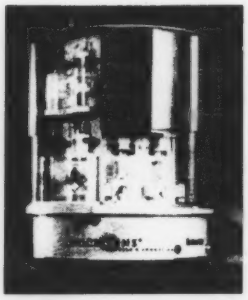
Slide 4

Genetic Testing Algorithm



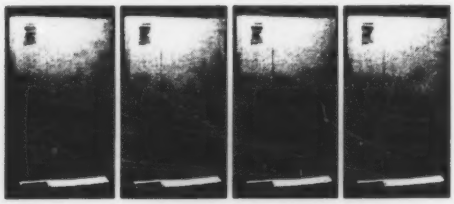
Slide 5

Extractor



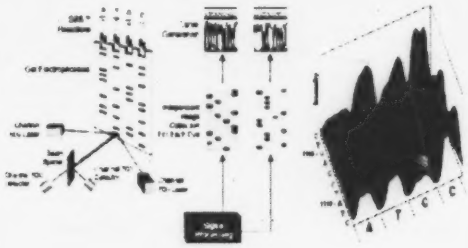
Slide 6

LiCor Sequencers



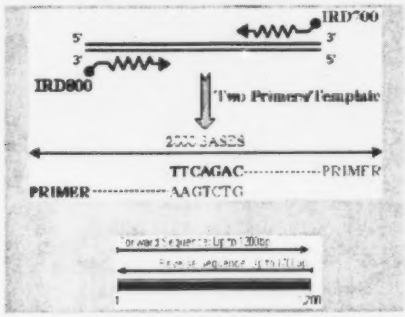
Slide 7

Li-Cor Automated DNA Sequencing



Slide 8

Simultaneous Bidirectional Sequencing (SBS)



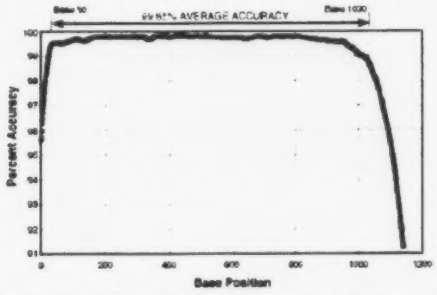
Slide 9

Overlapping Sequence Confirmation

- Overlapping Sequences Permit
- Multiplane stops
- Thermostable hairpin loops
- Distinct From Heterozygosity

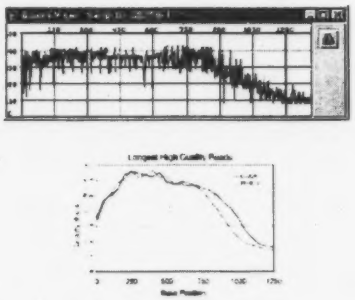
Slide 10

Accuracy



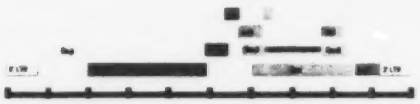
Slide 11

Quality



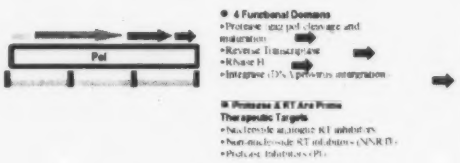
Slide 12

HIV Genome Organization



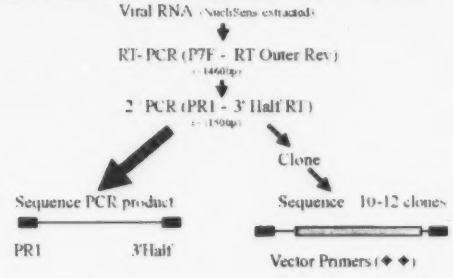
Slide 13

Pol Gene Analysis



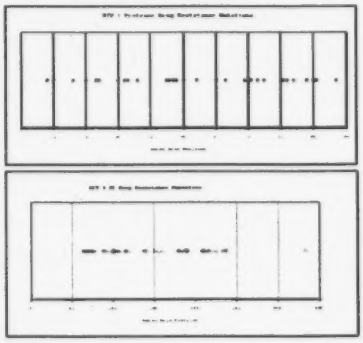
Slide 14

CHSDRSP DR Sequencing Protocol



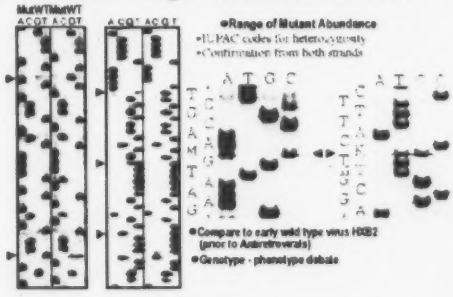
Slide 15

Scope of DR Mutations



Slide 16

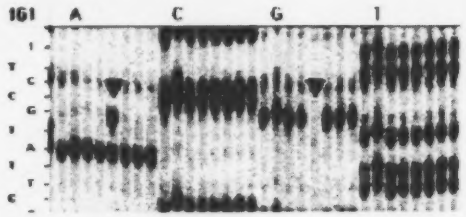
Antiviral Drug Resistance Detection



Slide 17

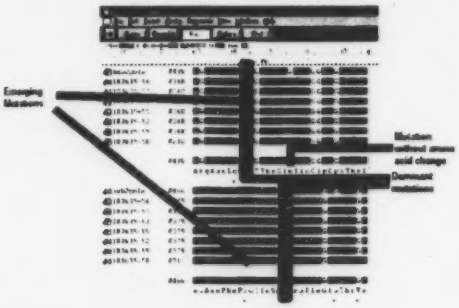
Rapid Screening for Mutants

- Reduce Workload
- Increase Throughput
- Li-Cor Can Define Lanes Regardless of Splits



Slide 18

DrugR Mutation Patterns



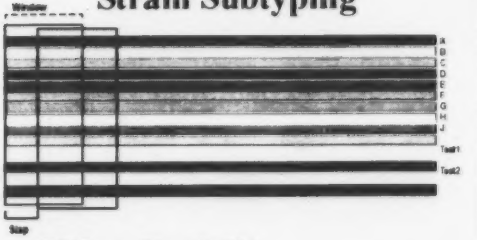
Slide 19

Sequence Analysis Software

- **Surveillance Subtyping**
  - BLAST
- **Detailed Phylogenetic Relationships**
  - CLUSTAL alignments, NJ trees
  - VESPA for signature patterns
- **Recombination**
  - BLAST
  - RIP

Slide 20

Strain Subtyping



- **BLAST: Basic Local Alignment Search Tool**
  - Altschul et al., 1990 - derivatives & updates
  - Protein and nucleic acid
  - Robust statistical interpretation relative background
  - Gapped alignments usable
  - Local alignments versus global => recombination detection

Slide 21

Phylogenetic Relationships

- **CLUSTAL (D. Higgins, J. Thompson: EMBL)**
  - Optimized alignment with user-definable parameters
  - Relatively rapid alignment
  - Integrated Neighbor-Joining Tree calculation
  - CLUSTAL V used in many commercial packages: had problems with differing sequence lengths and inappropriate end weighting. Corrected in CLUSTALW
- **VESPA (Viral Epidemiology Signature Pattern Analysis) (LANL)**
  - Detects atypical nucleotide (or amino acid) in a query set relative to a set of reference sequences
  - Forensic & epidemiological cluster analysis tool

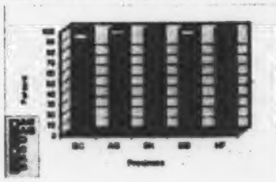
Slide 22

Viral Recombination

- **RIP: Recombination Identification Program (LANL)**
  - Moving window similar to BLAST
  - Step of 1 base rather than user-defined BLAST parameter
  - Similar to but not identical to BLAST given step value and statistical significance tests
  - Specialized vs. more generic BLAST
- **Subsequent steps**
  - Phylogenetic analysis of each fragment
  - Verify clustering in separate tree branches
  - Bootstrapping values to indicate robustness

Slide 23

HIV Subtype Results



Slide 24

Primary Mutations

Protease drug mutations*		RT drug mutations*	
NONE		NONE	
[illegible]	[illegible]	[illegible]	AZT
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
		[illegible]	[illegible]
		[illegible]	[illegible]
		[illegible]	[illegible]
		[illegible]	AZT, [illegible], 3TC, FTC,
		[illegible]	[illegible]
		[illegible]	[illegible]
		[illegible]	[illegible]
		[illegible]	[illegible]
		[illegible]	[illegible]
			[illegible]
			[illegible]
			AZT

Slide 25

Resistance Mutations

●9.1% of individuals in the sample population (N=830) were infected with HIV-1 harbouring primary DR mutations

Slide 26

The Future

●Further work on "interesting" samples
- New primer sets
- Full length sequence

●Technology development
- Non-sequence based screening for subtype DR
- Fluorescent barcodes

●Data Analysis
- Interesting samples
- Signature patterns
- Clusters
- Dual infections
- Points of interest

Slide 27

Conclusions

● Algorithm
- Extraction to amplification
- Clone or PCR product to sequence
- Read length & accuracy

●Analysis
- SBS ≻ confirmation of sequence
- Software tools for rapid yet robust analysis
- Specialized tools for in-depth analysis upon request

Slide 28

Identifying DR Mutations in the NLHG

National Laboratory for HIV Genetics

Tim Gleeson
Rick Barrette
Isabelle Joanisse

16 Molecular Indicators of Resistance Transmission (MIRT)

Dr. Rob Schuurman, University Medical Centre, Utrecht, The Netherlands

Slide 1

Molecular Indicators of Resistance Transmission (MIRTs)

Objectives:

- Define consensus criteria for the identification of drug-resistance transmission
- Based on the criteria develop an algorithm that enables analysis of the patient sequences for the presence of Molecular Indicators of Resistance Transmission (MIRTs)
- Publish, disseminate and use these rules in all further studies on resistance transmission (comparability!)
- Create (web-accessable) software package for easy identification of MIRTs in clinical samples and use in all transmission studies
- Continuous updating of the rules

Slide 2

Molecular Indicators of Resistance

Objectives:

- Identification of nucleotide polymorphisms (that may be be) associated with reduced drug-susceptibility
- Develop an algorithm that enables analysis of the patient sequences for the presence of Molecular Indicators of Resistance at three levels
  - Scientific level
  - Epidemiology level
  - Clinical level
- Continuous updating of the rules

Slide 3

Molecular Indicators of Resistance

Scientific level

- Identify all significant (nucleotide) changes relative to a database (per sub-type) of historical samples from the pre-drugs era (or retrospective yearly cohorts)
  - will allow identification of new mutations (resistance associated or not)
  - allows studying the natural history of the HIV epidemic (unique opportunity!)
  - generates large database of sequence from clinical samples of use for future studies
  - should be complemented with drug susceptibility determination

Slide 4

Molecular Indicators of Resistance

Epidemiology level

- Determine the nucleotide sequence heterogeneity at specific "resistance" codons
  - comparison to a database (per sub-type) of historical samples from the pre-drugs era (or retrospective yearly cohorts)
  - includes primary as well as secondary mutations, revertant as well as natural variants at these codons
  - to be based on a predefined list of codon-numbers and -sequences
  - identifies patterns of associated (secondary) mutations

Slide 5

Molecular Indicators of Resistance

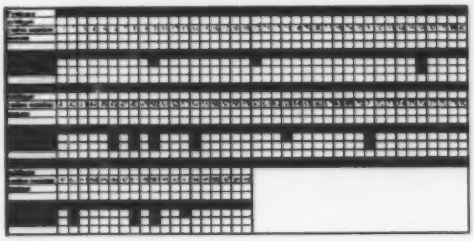
Clinical level

- Determine molecular indicators for resistance transmission by analysis of a specific list of "resistance" codons
  - comparison to a consensus table (per sub-type) of resistance codons including
    - Primary MIRTs (Pri-MIRTs)
    - Secondary MIRTs (Sec-MIRTs)
    - Reversion MIRTs (Rev-MIRTs)
- Transmission of resistance defined by
  - presence of one or more Pri-MIRTs in either RT or PR
  - presence of a combination of Sec-MIRTs (RT 3?, PR 5?)
  - presence of one or more Rev MIRTs in either RT or PR

Slide 6

Interpretation Algorithm

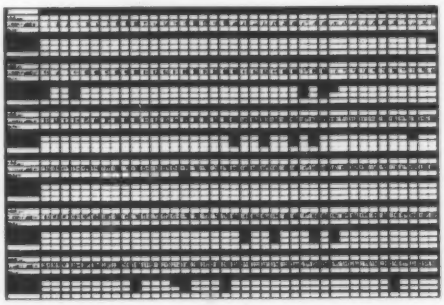
protease sub-type B



Slide 7

Interpretation Algorithm

RT sub-type B



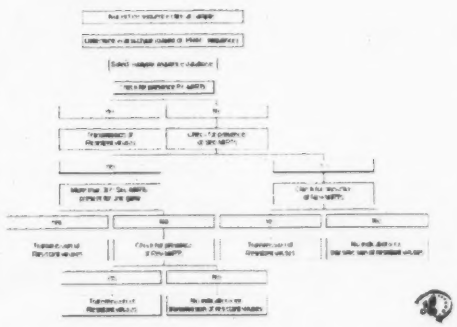
Slide 8

Operational plan

• Joined SPREAD-CDC-HC initiative (define workgroup)	March 2002
• Prepare a plan for consensus interpretation (inluding all mutations)	Apri/May 2002
• Present to the consortium at the Barcelona meeting (july 2002)	July 2002
• Present consensus to other parties involved (WHO, IAS, etc)	July 2002
• Create a web-accessable software program for standardized analysis based on consensus criteria	August 2002
• Disseminate and publish the results	Fall 2002

Slide 9

Clinical MIRT analysis



Slide 10

Definitions

Primary MIRTs (Pri-MIRTs):

- Nucleotide changes resulting in amino acid mutations in the RT or protease genes, that for a given subtype
  - have not been observed in untreated individuals or at least at a frequency of <5% (?) AND
  - on their own confer changes in susceptibility to one or more antivirals

Examples (incomplete):

- RT: M184V, T215Y, M41L, K103N, Q151M (Y181C for subtype B, not for A and C?)
- Pr: D30N, M48V, V82A, L90M

Slide 11

Definitions

Secondary MIRTs (Sec-MIRTs):

- Nucleotide changes that, for a given subtype, lead to amino acid mutations in the RT or protease genes and
  - are observed at an increased prevalence in treated individuals as compared to untreated individuals AND
  - facilitate Pri-MIRTs to result in a virus with reduced susceptibility, BUT
  - do not affect drug susceptibility when present in isolation

Examples (incomplete):

- RT: M214L, E40F
- PR: L10I, L63P, K20R

Slide 12

Definitions

Reversion MIRTs (Rev-MIRTs):

- Nucleotide changes in the amino acid codes of the RT or protease genes, that for a given subtype
  - are located at Pri-MIRT- or Sec-MIRT sites AND
  - for which the mutant codon involved a nucleotide change at 2 or more sites of the codon AND
  - for which the mutant codon had been partially reverted towards the original wildtype

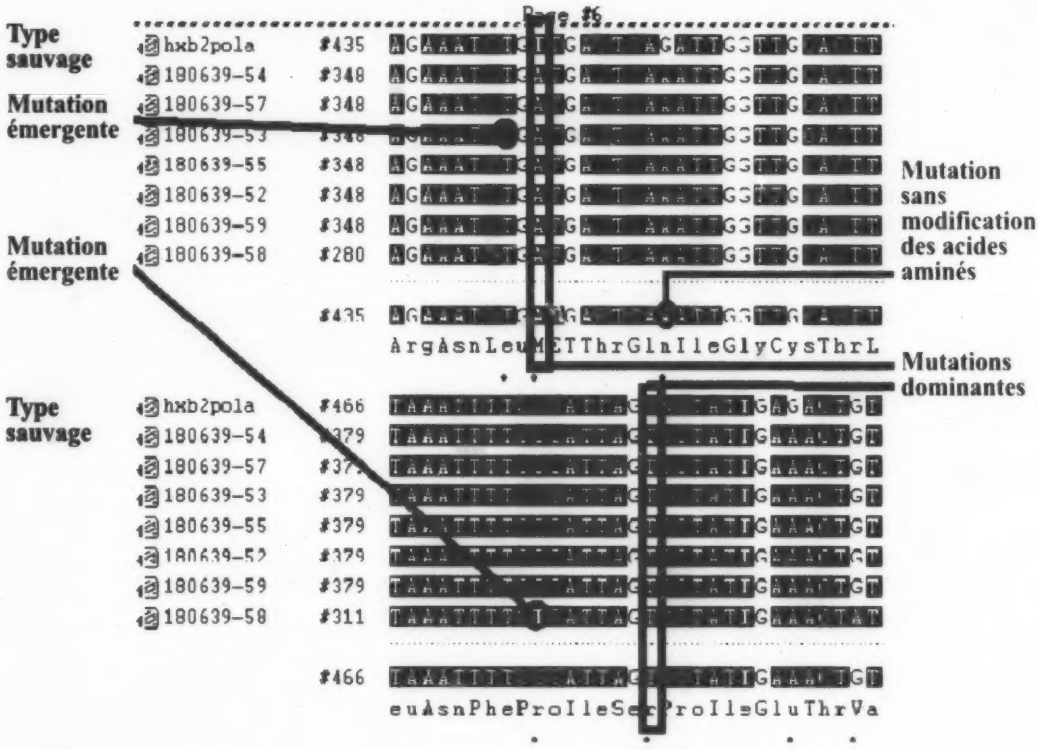
Examples (incomplete):

- RT: Y215 TAC --> GAC / TCC (wt ACC)
  D40 TTT --> TTA, (TAA), GTT, (GTA),GAT, (wt GAA)

Santé Canada Health Canada

Atelier sur la surveillance de la résistance aux médicaments anti-VIH

Rapport final



21 mars 2002

Canada

Notre mission est d'aider les Canadiens et les Canadiennes
à maintenir et à améliorer leur état de santé.

Santé Canada

© Sa Majesté la Reine du Chef du Canada, représentée par le ministre de Travaux publics et Services gouvernementaux Canada, 2002
N° de cat. H39-642/2002
ISBN 0-662-66838-3

Atelier sur la surveillance de la résistance aux médicaments anti-VIH

21 mars 2002
Ottawa, Canada

Rapport final

Préparé par
Sean Hosein et Theodore de Bruyn

Table des matières

Résumé 1

Introduction 5

Surveillance de la résistance primaire aux médicaments

1. **Prévalence et déterminants de la résistance primaire aux médicaments au Canada** 7
   Dre Gaya Jayaraman, Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses, Santé Canada

2. **British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS : Tendances récentes et défis associés aux tests de résistance aux médicaments anti-VIH** 10
   M. Rick Galli, British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS

3. **Étude Polaris : Transmission de souches du VIH-1 résistantes aux médicaments en Ontario** 12
   M. Richard Pilon, Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses, Santé Canada, pour le compte du groupe de l'étude Polaris

4. **Résistance à plusieurs médicaments dans l'étude du Québec sur la primo-infection à VIH-1** 13
   Dre Bluma G. Brenner, Centre sida McGill, Université McGill

5. **Étude SPREAD** 15
   Dr Rob Schuurman, University Medical Centre Utrecht, Pays-Bas

6. **Discussion** 17

Méthodes de laboratoire disponibles pour l'analyse de la résistance aux médicaments à des fins de surveillance

7. **Technologies actuelles d'identification de la résistance aux médicaments** 19
   M. Tim Gleeson, Laboratoire national de la génétique du VIH, Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses, Santé Canada

8. **Évaluation des tests de résistance génotypique aux médicaments** . . . 21
   M. Richard Pilon, Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses, Santé Canada

9. Comptes rendus des laboratoires provinciaux de santé publique 23

Alberta 23
Linda Chui, Microbiology and Public Health Laboratory, University of Alberta Hospital

Québec 23
Dr Hugues Charest, Laboratoire de santé publique du Québec;
Mme Micheline Fauvel, Laboratoire de santé publique du Québec

Manitoba 24
Dre Magdy Dawood, Laboratoire provincial Cadham

10. Discussion 25

Méthodes standardisées d'identification des mutations utiles pour la surveillance de la résistance aux médicaments

11. Méthode adoptée par le Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses pour identifier les mutations de résistance aux médicaments anti-VIH à des fins de surveillance 26
M. Tim Gleeson, Laboratoire national de la génétique du VIH, Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses, Santé Canada

12. Discussion 26

Aspects cliniques et stratégiques des tests de détection de la résistance aux médicaments anti-VIH

13. Aspects cliniques 29
Dr Andrew Badley, Division des maladies infectieuses, Hôpital d'Ottawa;
Dr Bill Cameron, Division des maladies infectieuses, Hôpital d'Ottawa;
Dr Dan Gregson, Infectious Diseases, Calgary Laboratory Services

14. Aspects stratégiques. 30
David Hoe, Division des politiques, de la coordination et des programmes sur le VIH/sida, Santé Canada

Sommaire 31
Dr Chris Archibald, Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses, Santé Canada

Annexe A : Liste des participants invités 32

Annexe B : Exposés 37

Résumé

Le 21 mars 2002, le Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses de Santé Canada a tenu un atelier sur la surveillance de la résistance aux médicaments anti-VIH. Des experts de toutes les régions du pays et de l'Union européenne y ont assisté (voir la liste des participants à l'annexe A).

Cette rencontre devait essentiellement permettre de discuter d'un processus qui servirait à normaliser les méthodes de laboratoire utilisées pour détecter les mutations des gènes du VIH et à interpréter ces mutations, de manière à assurer un suivi de l'incidence et de la prévalence de la résistance aux médicaments anti-VIH au Canada.

Le présent rapport résume les exposés et les discussions de l'atelier. Des données additionnelles concernant les exposés sont fournies à l'annexe B.

Objectifs de l'atelier

L'atelier avait pour objectifs :

- de présenter les résultats du Programme canadien de surveillance des souches et de la résistance aux médicaments ayant trait au VIH ainsi que d'en discuter;
- de mettre en commun les connaissances sur les méthodes de laboratoire disponibles pour l'analyse génétique de la résistance primaire aux médicaments anti-VIH à des fins de surveillance;
- d'explorer des façons de normaliser l'interprétation des résultats concernant la résistance génétique aux médicaments;
- de discuter de la résistance aux médicaments détectée au moment du diagnostic d'infection à VIH (résistance primaire aux médicaments), sur les plans de la pratique clinique, de la santé publique et des politiques.

Résultats escomptés

L'atelier devait permettre :

- une revue des sources de données et des méthodes de laboratoire utiles pour la surveillance de la résistance primaire aux médicaments anti-VIH au Canada;
- une discussion sur les façons possibles de normaliser la définition des mutations jugées significatives pour la surveillance;
- un examen de ce que signifient les constatations actuelles aux plans de la pratique clinique et des politiques;
- une discussion sur les orientations futures de la surveillance de la résistance aux médicaments au Canada.

Résistance aux médicaments anti-VIH

On sait depuis longtemps que le VIH peut devenir résistant aux médicaments antirétroviraux. Il subit des transformations – appelées mutations – de son matériel génétique qui lui permettent de combattre l'action des médicaments. Lorsque la prise d'antirétroviraux ne permet pas d'assurer une suppression complète du virus, on peut voir apparaître et proliférer des mutations résistantes aux médicaments. C'est ce qui s'appelle une résistance secondaire aux médicaments.

Ce qui est particulièrement inquiétant, c'est le fait que des mutations résistantes aux médicaments commencent maintenant à être observées chez des personnes nouvellement infectées qui n'ont jamais pris d'antirétroviraux. C'est ce qui s'appelle la résistance primaire aux médicaments. Dans certains cas, les mutations confèrent une résistance à une classe de médicaments. Dans d'autres cas, elles ont un effet plus vaste et confèrent une résistance à au moins deux classes d'antirétroviraux. C'est ce qui s'appelle la résistance multimédicamenteuse ou résistance à plusieurs médicaments.

Au Canada, la prévalence de la résistance primaire à au moins un antirétroviral se situe entre 4,5 % et 20 %. La prévalence de la résistance primaire à au moins deux classes d'antirétroviraux se situe entre 0,3 % et 9,9 %[1]. Les données du Québec et de l'Ontario laissent supposer que les mutations de la résistance primaire persistent dans le temps, même en l'absence d'antirétrovirothérapie.

Conséquences en matière de santé publique et de politiques

La résistance aux médicaments et la transmission de virus résistants aux médicaments ont certaines conséquences en matière de santé publique et de politiques, dont les suivantes :

- La résistance aux médicaments accroît la complexité et réduit l'efficacité de l'antirétrovirothérapie. Quel sera l'effet d'une prévalence accrue des mutations de résistance sur l'antirétrovirothérapie?
- Quels sont les corrélats entre les tests de résistance aux médicaments et les issues cliniques chez les personnes infectées par le VIH? Les mutations de résistance ne sont pas toutes cliniquement pertinentes.
- Quel est ou sera le rôle des tests de résistance aux médicaments dans le contexte des soins cliniques? À l'heure actuelle, leur valeur dans le contexte d'un échec thérapeutique semble limitée, mais leur rôle pourrait changer si davantage de personnes étaient infectées par un virus résistant aux médicaments.
- La disponibilité des tests de résistance et la capacité d'interpréter les résultats de ces tests sont-elles réparties également dans l'ensemble du pays? Des discussions informelles à l'occasion de l'atelier ont laissé supposer qu'elles ne le sont pas.

---

1 Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses, Santé Canada. *Actualités en épidémiologie sur le VIH/sida : Résistance primaire aux médicaments antirétroviraux utilisés dans le traitement du VIH au Canada.* Avril 2002.

Quel sera l'effet de cette situation sur les soins prodigués aux personnes infectées par le VIH?

- Quelles sont les conséquences cliniques et économiques de la résistance primaire aux médicaments? Les données tendent à démontrer que les mutations de résistance chez les personnes qui n'ont jamais pris d'antirétroviraux peuvent persister longtemps, jusqu'à 5 ans selon l'étude québécoise sur la primo-infection.
- Quelles mesures prend-on pour prévenir ou minimiser la transmission des souches du VIH résistantes aux médicaments? Il s'agit d'une question complexe, combinant non seulement des mesures de prévention visant à réduire la transmission du virus, mais également les soins, les traitements et le soutien requis pour prévenir et prendre en charge le développement de virus résistants aux médicaments chez les personnes prenant des antirétroviraux.

Surveillance de la résistance aux médicaments

De toute évidence, la surveillance des mutations de résistance aux médicaments au Canada doit être intensifiée et coordonnée pour que nous puissions avoir une image plus complète de la prévalence de cette résistance et de la transmission de souches virales résistantes aux médicaments parmi la population. Plusieurs projets de recherche sont actuellement en cours (notamment en Colombie-Britannique, en Ontario et au Québec), et un programme de surveillance commun a été mis sur pied (le Programme canadien de surveillance des souches et de la résistance aux médicaments ayant trait au VIH). L'information communiquée par les scientifiques participant à ces initiatives a été un important résultat de l'atelier.

Les participants à l'atelier ont identifié plusieurs questions qui nécessitent une étude plus attentive :

- Quelles mutations faut-il considérer comme significatives aux fins de la surveillance? Cette question se pose en raison du fait que le taux de mutation du VIH est relativement élevé et que les mutations ne confèrent pas toutes une résistance aux médicaments. En outre, la liste des mutations significatives aux fins de la surveillance épidémiologique peut différer de la liste des mutations significatives aux fins des soins cliniques. Différentes catégories de mutations ont été considérées :
  - les mutations primaires (associées à la résistance aux médicaments comme telle et non observées préalablement chez les sujets non traités);
  - les mutations secondaires (associées à la résistance aux médicaments uniquement par rapport aux mutations primaires et observées avec une prévalence plus grande chez les sujets traités que chez les sujets non traités);
  - les mutations réverses (situées en un site de mutation primaire ou secondaire, indiquant ainsi qu'un virus résistant aux médicaments est partiellement redevenu sauvage).

- Quel est l'intérêt des sous-types non-B du VIH-1 dans le contexte de la résistance aux médicaments, des tests de résistance aux médicaments et de la surveillance de la résistance aux médicaments? La prévalence des sous-types non-B est d'environ 8 % au Canada. Les techniques de détection de la résistance et les bases de données conçues pour le sous-type B ne permettent pas de détecter les mutations dans les sous-types non-B. On sait peu de choses de la façon dont se comportent les sous-types non-B résistants aux médicaments par rapport aux sous-types non-B sauvages.
- Les laboratoires canadiens n'utilisent pas les mêmes méthodes et le même équipement. La mise en œuvre de programmes de contrôle de la qualité et de normalisation des tests de détection de la résistance serait une étape importante qui aiderait à améliorer la surveillance nationale de la résistance aux médicaments.

Prochaines étapes

On note clairement un besoin urgent de produire une liste des mutations, notamment des mutations primaires et de certaines mutations secondaires, qui aient une utilité pour la surveillance de la résistance aux médicaments. Il faudrait clarifier et confirmer les définitions de ces mutations. Santé Canada collaborera avec ses partenaires nationaux à l'établissement d'une liste des mutations sur lesquelles devraient porter la surveillance et la recherche. Parallèlement, Santé Canada collaborera avec ses partenaires internationaux – les Centers for Disease Control and Prevention (États-Unis), l'Union européenne (SPREAD) et l'Organisation mondiale de la Santé – en vue de mettre en commun l'information disponible et de parvenir à un consensus sur les mutations à surveiller.

Introduction

Le 21 mars 2002, le Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses (CPCMI) de Santé Canada a tenu un atelier sur la surveillance de la résistance aux médicaments anti-VIH. Des experts de toutes les régions du pays et de l'Union européenne y ont assisté (voir l'annexe A).

Cette rencontre devait essentiellement permettre de discuter d'un processus qui servirait à normaliser les méthodes de laboratoire utilisées pour détecter les mutations des gènes du VIH et à interpréter ces mutations, de manière à assurer un suivi de l'incidence et de la prévalence de la résistance aux médicaments anti-VIH au Canada.

Le présent rapport résume les exposés et les discussions de l'atelier. Des données additionnelles concernant les exposés sont fournies à l'annexe B.

Objectifs

L'atelier avait pour objectifs :

- de présenter les résultats du Programme canadien de surveillance des souches et de la résistance aux médicaments ayant trait au VIH ainsi que d'en discuter;
- de mettre en commun les connaissances sur les méthodes de laboratoire disponibles pour l'analyse génétique de la résistance primaire aux médicaments anti-VIH à des fins de surveillance;
- d'explorer des façons de normaliser l'interprétation des résultats concernant la résistance génétique aux médicaments;
- de discuter de la résistance aux médicaments détectée au moment du diagnostic de d'infection à VIH (résistance primaire aux médicaments), sur les plans de la pratique clinique, de la santé publique et des politiques.

Résultats

L'atelier devait permettre :

- une revue des sources de données et des méthodes de laboratoire utiles pour la surveillance de la résistance primaire aux médicaments anti-VIH au Canada;
- une discussion sur les façons possibles de normaliser la définition des mutations jugées significatives pour la surveillance;
- un examen de ce que signifient les constatations actuelles aux plans de la pratique clinique et des politiques;
- une discussion sur les orientations futures de la surveillance de la résistance aux médicaments au Canada.

Définitions

Résistance primaire aux médicaments :

...Résistance aux antirétroviraux observée chez des personnes qui n'ont jamais pris d'antirétroviraux (patients naïfs d'antirétroviraux), présumément en raison de la transmission d'une souche virale résistante aux médicaments au moment de l'infection.

Résistance secondaire aux médicaments :

...Résistance aux médicaments observée chez des personnes qui reçoivent déjà un traitement (patients expérimentés), présumément en raison d'une suppression incomplète du virus qui entraîne l'échec du traitement.

Résistance multimédicamenteuse :

...Résistance à plus d'une classe d'antirétroviraux (inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse ou INTI, inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse ou INNTI, et inhibiteurs de protéase ou IP).

Mutations primaires :

...Mutations dans la séquence virale qui sont en soi fortement associées à la résistance aux médicaments et qui n'ont pas précédemment été observées chez des sujets non traités.

Mutations secondaires :

...Mutations dans la séquence virale dont la prévalence est plus grande chez les sujets traités que chez les sujets non traités et qui sont associées à la résistance aux médicaments uniquement lorsqu'elles sont combinées à d'autres mutations primaires.

Résistance phénotypique :

...Les tests de résistance phénotypique mesurent la quantité de médicament requise pour inhiber la réplication du virus, comparativement au virus sauvage.

Résistance génotypique :

...Les tests de résistance génotypique identifient les mutations dans la séquence virale que l'on soupçonne ou sait être associées à la résistance aux médicaments.

Surveillance de la résistance primaire aux médicaments

1 Prévalence et déterminants de la résistance primaire aux médicaments au Canada

Dre Gaya Jayaraman, Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses, Santé Canada

Le Programme canadien de surveillance des souches et de la résistance aux médicaments ayant trait au VIH (PCSSRMV) a notamment pour buts :

- d'évaluer les marqueurs génétiques de la résistance primaire aux antirétroviraux;
- de suivre la prévalence de la résistance primaire aux médicaments en vue de formuler des recommandations concernant le traitement initial des patients naïfs (particulièrement dans les cas de grossesse et de prophylaxie post-exposition);
- d'utiliser la transmission de souches du VIH résistantes aux médicaments comme indicateur pour aider à évaluer les programmes de prévention et à orienter les politiques.

Actuellement, le PCSSRMV réunit les partenaires suivants :

- le CPCMI de Santé Canada;
- le British Columbia Centre for Disease Control;
- Alberta Health and Wellness, Provincial Laboratory for Public Health, Université de l'Alberta et Université de Calgary;
- Saskatchewan Health;
- Santé Manitoba;
- Laboratoire de santé publique de l'Ontario;
- Department of Public Health de la Nouvelle-Écosse;
- Public Health Laboratory, Department of Health and Community Services de Terre-Neuve.

Méthodes de surveillance

Le CPCMI, en collaboration avec ses partenaires provinciaux/territoriaux, les Laboratoires nationaux du VIH/sida ainsi que la Division de l'épidémiologie et de la surveillance du VIH/sida, évaluent les échantillons de sérum obtenus afin de détecter des souches du VIH résistantes aux médicaments chez des personnes naïves d'antirétroviraux. Le CPCMI examine plus particulièrement les

changements du gène *pol* (polymérase) du VIH, codant pour les enzymes transcriptase inverse, protéase et intégrase.

Les échantillons viraux de l'étude sont séquencés et comparés au virus sauvage de référence HXB2, qui a été isolé avant le recours aux antirétroviraux. Les changements dans les séquences virales sont identifiés et comparés à des bases de données sur la résistance aux médicaments, tenues à l'Université Stanford et au Los Alamos National Laboratory.

Résultats préliminaires

Au cours de l'atelier, le CPCMI a fourni des données sur 706 sujets dont les séquences virales avaient été amplifiées. Les niveaux de résistance suivants ont été observés :

- 4,4 % (31 sujets) présentaient des mutations de la transcriptase inverse;
- 1,7 % (12 sujets) présentaient des mutations de la protéase;
- 0,1 % (1 sujet) présentait des mutations de la protéase et de la transcriptase inverse.

Caractéristiques des personnes présentant des mutations de résistance primaire aux médicaments :

- adultes des deux sexes;
- de 16 à 69 ans (la majorité ayant entre 15 et 39 ans);
- les facteurs de risque d'infection incluaient les relations sexuelles entre hommes, l'utilisation de drogues injectables et les relations hétérosexuelles;
- la plupart des ethnies étaient représentées;
- des cas d'infection par les sous-types A, B et C du VIH-1 ont été documentés;
- des mutations de résistance ont été observées dans des échantillons de six provinces.

Conclusions

- Le projet a fourni des preuves de résistance primaire aux ITI et IP.
- Une souche de VIH-1 résistante à plusieurs médicaments a été identifiée chez au moins une personne naïve d'antirétroviraux.
- La prévalence de souches du VIH-1 présentant des mutations de résistance primaire aux médicaments est d'environ 6,2 %.
- La résistance primaire a été identifiée par rapport à différents âges, régions, expositions aux risques, ethnies et sous-types (A, B et C) du VIH-1.

Points à considérer

La Dre Jayaraman a signalé un certain nombre de points non résolus dont il faut tenir compte dans la surveillance de la résistance aux médicaments, soit :

- la qualité des échantillons obtenus pour le génotypage de la résistance aux médicaments;
- la capacité d'identifier les mutations dans les sous-espèces minoritaires;
- la capacité d'identifier les mutations dans les sous-types non-B;
- la détermination des mutations à surveiller (voir dans l'exposé à l'annexe B la liste préliminaire des mutations primaires associées à la résistance aux INTI, INNTI et IP);
- le manque de normalisation des tests de résistance aux médicaments;
- la pertinence des mutations identifiées sur les plans de la pratique clinique et/ou de la santé publique.

En outre, il existe des lacunes dans les données épidémiologiques – facteurs de risque, ethnie, année où l'infection à VIH a initialement été diagnostiquée chez le sujet, antécédents de traitement – que le PCSSRMV a recueillies. Et ces données concernent uniquement les sujets présentant des mutations « stables ».

Orientations futures

Le PCSSRMV aimerait à l'avenir :

- recueillir des renseignements sériques et épidémiologiques sur tous les nouveaux cas d'infection à VIH diagnostiqués, afin d'avoir une image plus claire de l'émergence d'une résistance primaire aux médicaments anti-VIH;
- utiliser des tests d'incidence pour suivre les tendances dans les infections « récentes »;
- recourir à une analyse phylogénétique basée sur une population pour évaluer les profils de transmission;
- assurer la liaison avec les intervenants nationaux en vue d'exercer une influence sur les programmes et politiques de prévention et de traitement;
- collaborer avec des organisations internationales à la surveillance mondiale des tendances.

British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS : Tendances récentes et défis associés aux tests de résistance aux médicaments anti-VIH

M. Rick Galli, British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS

Le centre d'excellence a commencé en 1997 à élaborer un programme d'analyse génotypique d'échantillons sanguins basée sur le séquençage et il a par la suite collaboré avec Tibotec-Virco NV en vue d'avoir accès à sa base de données VirtualPhenotype. En 1999, il a offert des tests de résistance aux médicaments anti-VIH en tant que service clinique dans la province de la Colombie-Britannique et, plus tard au cours de la même année, dans l'ensemble du Canada. À ce jour, environ 8 500 tests ont été effectués sur des échantillons provenant de 1 500 patients de la Colombie-Britannique et 7 000 autres ont été effectués pour des patients du reste du Canada.

Tendances temporelles dans les tests de résistance aux médicaments

En analysant les données du centre d'excellence, les chercheurs ont relevé quatre tendances fondamentales :

- INTI : La résistance à l'abacavir (Ziagen, ABC) était plus forte en 1996-1997 qu'au cours des années subséquentes, même si ce médicament n'a commencé à être largement utilisé qu'en 1999. Ceci laisse supposer que les mutations peuvent conférer une résistance croisée dans une classe de médicaments.
- IP : La résistance au nelfinavir (Viracept) est demeurée « systématiquement plus élevée » que la résistance aux autres IP en raison de la prévalence accrue de la mutation D30N.
- INNTI : La prévalence de la mutation K103N a augmenté avec le temps. L'acquisition de cette seule mutation confère une résistance aux trois INNTI actuellement homologués : efavirenz (Sustiva), delavirdine (Rescriptor) et névirapine (Viramune).
- Globalement, les niveaux de résistance primaire aux médicaments en C.-B. semblent se situer entre 4 % et 8 %.

Résistance primaire aux médicaments anti-VIH-1 : Changements de $p6^{gag}$

Les chercheurs ont récemment concentré leur attention sur les changements dans la région de l'extrémité N de la protéine $p6^{gag}$ du VIH chez des sujets naïfs d'antirétroviraux qui entreprenaient un traitement antirétroviral. Cette région code pour une protéine active à la fin du cycle viral, qui coïncide avec l'encapsidation *pol*, la détermination de la taille des particules et le bourgeonnement. Selon une équipe suisse[2], des changements de $p6^{gag}$ sont observés chez jusqu'à 21 % des patients

2 Peters S, Muñoz M, Yerly S et coll. Resistance to nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors mediated by human immunodeficiency virus type 1 p6 protein. *Journal of Virology* 2001; 75(20): 9644-653. Disponible à l'adresse : http://jvi.asm.org/content/vol75/issue20.

traités avec des analogues nucléosidiques, mais seulement environ 5 % des patients naïfs d'antirétroviraux. En outre, il a été établi que les mutations dans cette région sont associées à une infectiosité accrue et au développement d'une résistance aux médicaments. À la Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections de 2002, Smith et coll. ont présenté des données laissant supposer que la fréquence accrue des changements de $p6^{gag}$ dans les cas de primo-infection à VIH est associée à une incidence accrue d'infections par des souches virales résistantes aux médicaments[3].

Des chercheurs du centre d'excellence ont récemment passé en revue des données sur une cohorte de 431 sujets naïfs d'antirétroviraux. La prévalence de $p6^{gag}$ était de 14,8 %. L'apport de changements dans cette région était associé à une plus forte charge virale plasmatique de base et à une numération des CD4+ moins élevée. Toutefois, les mutations dans cette région n'étaient pas associées à l'acquisition d'une résistance de base aux médicaments.

Variabilité des tests de résistance aux médicaments anti-VIH basés sur le séquençage

Dans un certain nombre d'expériences, des comparaisons ont révélé un degré élevé de concordance (environ 99,0 %) entre la méthode de génotypage interne du centre d'excellence et la méthode Trugene de Visible Genetics.

Défis que présente la normalisation des données sur la résistance aux médicaments

La normalisation de la recherche sur la résistance aux médicaments présente plusieurs difficultés :

- À l'heure actuelle, 16 antirétroviraux sont largement utilisés au Canada – ce qui représente un minimum de 1 100 choix pour les trithérapies.
- Au moins 240 mutations sont associées à une résistance aux médicaments.
- Il est possible que certaines mutations s'inversent avec le temps.
- Les méthodes d'interprétation des résultats des tests de résistance ne sont pas encore normalisées – méthodes basées sur des règles par opposition à VirtualPhenotype.
- Comme les critères d'observance du traitement anti-VIH sont extrêmement stricts et que les régimes thérapeutiques sont complexes, on ne devrait pas être étonné d'observer des mutations de résistance complexes chez des patients qui prennent des antirétroviraux.

---

3 Smith D, Little SJ, Daar ES et coll. Genetic variation in p6gag in primary HIV infection. 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Abstract 357-M. Disponible à l'adresse : www.retroconference.org/2002/Abstract/13195.htm

Le centre d'excellence participe à plusieurs projets de collaboration avec d'autres équipes de chercheurs – Research Diagnostics Inc. (Toronto) et le Forum for Collaborative HIV Research (Université George Washington, Washington, D.C.) – en vue de documenter l'émergence de mutations de résistance en association avec la réponse au traitement. On espère parvenir à créer une vaste base de données multinationale faisant la corrélation entre la résistance et des mesures des résultats.

Étude Polaris : Transmission de souches du VIH-1 résistantes aux médicaments en Ontario

M. Richard Pilon, Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses, Santé Canada, pour le compte du groupe de l'étude Polaris

Étude Polaris

L'étude Polaris est une étude par observation d'une cohorte bien définie de personnes récemment infectées par le VIH, qui s'échelonne sur une période de 5 ans. Elle a pour buts :

- de déterminer pourquoi et comment les patients deviennent infectés (facteurs sociaux et épidémiologiques);
- de caractériser le virus infectieux;
- de déterminer le taux de transmission de souches du VIH résistantes aux médicaments en Ontario;
- de surveiller les changements de la résistance aux médicaments dans le temps;
- d'établir une corrélation entre les constatations et l'évolution de la maladie.

Participation

Pour participer à l'étude Polaris, il faut satisfaire aux critères suivants :

- avoir eu des résultats positifs pour le VIH au cours des 12 derniers mois *et* avoir préalablement eu des résultats négatifs au cours des 2 dernières années; ou
- avoir eu des résultats indéterminés pour le VIH, suivis de résultats positifs dans un délai de 12 mois.

On interviewe les participants en vue de recueillir de l'information socio-épidémiologique pertinente, notamment quant aux facteurs de risque, aux démarches relatives aux tests ainsi qu'aux symptômes. Des échantillons de plasma et des données cliniques sont obtenus au départ (peu de temps après l'admission) et tous les 6 mois pendant 5 ans. Depuis 1998, plus de 100 participants ont été admis et moins de 5 % par année ont abandonné l'étude.

Résultats

On dispose des séquences du VIH pour 63 des 100 participants. Parmi ceux-ci, 43 ont été identifiés comme étant naïfs d'antirétroviraux. Cinq (11,6 %) des 43 présentent des mutations associées à la résistance aux médicaments. Toutes les mutations sont liées à des changements de l'enzyme transcriptase inverse, conférant une résistance aux INTI et INNTI (voir l'annexe B). Aucune résistance aux IP n'a été détectée.

Les mutations semblent persister au cours de l'étude, dans certains cas jusqu'à 4 ans. Certaines mutations (V179D et V106A) font en sorte que le virus présente une capacité réplicative inférieure à celle du virus sauvage. En théorie, les virus manifestant de telles mutations devraient avec le temps être remplacés par un virus sauvage plus apte à se répliquer. D'autres mutations (M41L) ne semblent pas avoir d'effets sur la capacité réplicative et devraient être relativement stables.

Conclusions

- On peut observer la transmission de souches du virus résistantes aux médicaments (résistance primaire aux INTI et INNTI chez 11,6 % des participants à l'étude).
- Un virus résistant aux médicaments qui est transmis persiste en l'absence d'antirétrovirothérapie pendant une période pouvant atteindre 4 ans après un diagnostic d'infection à VIH.
- Il faudrait étudier davantage les sujets qui présentent une résistance primaire aux médicaments en vue de déterminer ce qu'il advient de différentes mutations chez différentes personnes.

4. Résistance à plusieurs médicaments dans l'étude du Québec sur la primo-infection à VIH-1

Dre Bluma G. Brenner, Centre sida McGill, Université McGill

L'étude de Montréal sur la primo-infection à VIH-1 a pour objectifs :

- de déterminer la prévalence de la résistance aux médicaments dans les cas de primo-infection à VIH-1;
- d'évaluer les changements dans le temps du génome du VIH résistant à plusieurs médicaments;
- de vérifier l'effet du VIH résistant à plusieurs médicaments sur la charge virale et la numération des CD4+;
- d'évaluer la capacité des virus résistants à plusieurs médicaments par rapport aux virus sauvages.

Résultats

À ce jour, l'étude a permis de recueillir des données sur 137 personnes atteintes d'une primo-infection à VIH. Parmi celles-ci,

- 19 % (27) ne présentent aucune mutation de résistance détectable;
- plus de 68 % (101) présentent des mutations secondaires détectables qui, en soi, ne confèrent aucune résistance phénotypique;
- 4,8 % (7) présentent des mutations de résistance à une seule classe de médicaments;
- 5,5 % (8) présentent une résistance détectable à plusieurs médicaments.

Le taux de 5,5 % de résistance à plusieurs médicaments observé à Montréal est supérieur à celui constaté dans le cadre d'autres études :

- Genève (n = 82) : 1,3 %
- New York (n = 80) : 3,8 %
- Californie (n = 141) : 2,1 %

Les données provenant de l'étude sur les tendances temporelles de la résistance phénotypique à des classes de médicaments spécifiques (voir les détails à l'annexe B) tendent à démontrer l'augmentation de la prévalence dans le temps (1996-2001) de la résistance aux INNTI. Ces données concordent avec les données provenant du British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS.

Les données de l'étude laissent également supposer :

- que la résistance du VIH à plusieurs médicaments persiste dans le temps, peut-être à cause de l'existence de réservoirs du virus;
- que le VIH résistant à plusieurs médicaments semble provoquer une virémie plus faible que le VIH sauvage (dans un cas de primo-infection par une souche résistante à plusieurs médicaments, l'augmentation de la virémie était associée à une réinfection par le virus sauvage);
- que le VIH résistant à plusieurs médicaments compromet la capacité réplicative.

Voir les détails additionnels à l'annexe B.

Le groupe d'étude a observé que, depuis octobre 2001, environ 10 % des sujets sont infectés par des sous-types non-B du VIH-1, soit habituellement par les sous-types C et A. Le sous-type C présente une grande capacité comparativement aux autres sous-types.

Conclusions

Les données de l'étude de Montréal sur la primo-infection à VIH-1 révèlent que :

- 10,3 % des cas de primo-infection à VIH présentent des mutations de résistance aux médicaments;
- 5,5 % des cas de primo-infection à VIH sont atteints d'une souche résistante à plusieurs médicaments;
- les infections résistantes à plusieurs médicaments peuvent persister dans le temps;
- la charge virale résistante à plusieurs médicaments est relativement faible. Il faudrait étudier davantage l'effet de la réinfection par une souche du virus ayant une capacité supérieure;
- les souches du virus résistantes à plusieurs médicaments ont une capacité assez faible. Les infections à VIH résistantes à plusieurs médicaments sont transmises par des personnes chez lesquelles le virus résistant à plusieurs médicaments constitue une part importante de la population virale;
- 7,7 % des patients du Québec sont infectés par un sous-type non-B qui semble avoir une grande capacité. Il faudrait étudier l'effet du traitement chez les sujets atteints du sous-type C par opposition aux autres sous-types.

Étude SPREAD

Dr Rob Schuurman, University Medical Centre Utrecht, Pays-Bas

Introduction

L'étude SPREAD est un programme européen de surveillance de la résistance aux médicaments anti-VIH. Les pays suivants participent actuellement au programme : l'Autriche, la Belgique, le Danemark, la Finlande, l'Allemagne, la Grèce, l'Irlande, l'Italie, le Luxembourg, les Pays-Bas, la Norvège, la Pologne, le Portugal, l'Espagne, la Suède et le Royaume-Uni. On prévoit également y faire participer neuf États qui ont récemment adhéré à l'Union européenne : la Bulgarie, Chypre, la République tchèque, l'Estonie, la Hongrie, la Lettonie, la Roumanie, la Slovaquie et la Slovénie.

Dans chaque pays, l'infrastructure nationale comprendra un clinicien représentatif, un virologiste représentatif et un épidémiologiste représentatif. Ceux-ci seront associés respectivement au groupe de travail clinique européen, au groupe de travail virologique européen et au groupe de travail épidémiologique européen.

Objectifs

L'étude a pour objectifs :

- la mise sur pied d'un programme européen de surveillance;
- la collecte de données comparables et fiables sur la transmission de la résistance aux médicaments anti-VIH;

- la création d'un réseau de laboratoires de référence;
- la détermination de l'incidence et des profils globaux de la transmission de souches du VIH résistantes aux médicaments dans le temps, pour chaque pays;
- l'étude de l'incidence de différents sous-types du VIH et de la relation avec des profils de résistance mutationnelle;
- l'analyse de la relation entre l'incidence de transmission et la nature de la consommation d'antirétroviraux et des lignes directrices;
- la mise au point de modèles permettant de prédire les tendances futures de la transmission de la résistance aux médicaments anti-VIH.

Population visée par l'étude

On espère pouvoir recruter pour l'étude des patients ayant réellement séroconverti et des patients chez lesquels l'infection à VIH a nouvellement été diagnostiquée :

- Les patients ayant réellement séroconverti n'ont pas été exposés à une antirétrovirothérapie et ils ont soit obtenu des résultats négatifs au test ELISA et des résultats positifs au test de l'ARN-VIH plasmatique, ou des résultats positifs au test ELISA et des résultats indéterminés au test Western blot. Ce sont les sujets les plus intéressants sur le plan épidémiologique, mais ils sont aussi les plus difficiles à recruter.
- Les patients chez lesquels l'infection à VIH a nouvellement été diagnostiquée n'ont jamais été exposés aux antirétroviraux et ils ont soit obtenu des résultats positifs au test ELISA ou des résultats positifs au test de détection de l'ARN-VIH plasmatique, ou des résultats positifs au test ELISA et des résultats positifs au test Western blot. Ils peuvent eux-mêmes être intéressés à savoir s'ils présentent une résistance. Toutefois, chez ces patients, il est possible que le virus sauvage ait surpassé le virus résistant, ou que le virus résistant soit redevenu sauvage.

Pour aider à identifier les sujets potentiels, il peut être nécessaire de recourir à des dosages « désaccordés » basés sur les peptides. Il peut également être possible d'effectuer des études au sein de cohortes, si des donneurs et receveurs peuvent être appariés.

Collecte de données

Les données suivantes seront recueillies :

- données cliniques et comportementales : âge, sexe, région, statut immunitaire, voie et date de transmission, facteurs de risque, etc.;
- données épidémiologiques : prévalence et incidence nationales du VIH, distribution géographique, lignes directrices thérapeutiques nationales, thérapies antirétrovirales administrées;
- données virologiques : charge virale, analyse de la résistance génotypique et phénotypique, contrôle de la qualité.

Nature des tests de résistance

Dans le cadre de l'étude, on entend effectuer :

- des tests de résistance génotypique sur 4 000 échantillons, à la recherche de changements dans les gènes protéase et transcriptase inverse (les tests seront effectués dans les pays participants, avec contrôle de la qualité);
- des tests de résistance phénotypique sur 400 échantillons (l'exécution de ces tests sera centralisée).

Voir à l'annexe B les détails sur la création et le maintien d'un réseau de contrôle de la qualité pour les tests de résistance génotypique.

Collaboration

L'équipe de l'étude SPREAD collabore avec d'autres pays et organismes qui s'occupent de surveiller la résistance du VIH, notamment avec :

- le groupe EuroGuidelines;
- les Centers for Disease Control and Prevention des États-Unis;
- le CPCMI de Santé Canada;
- le European AIDS Treatment Group;
- l'Organisation mondiale de la santé;
- d'autres pays et organisations qui ont déjà accumulé des connaissances sur la transmission de la résistance aux médicaments anti-VIH.

Discussion

Principaux points qui se sont dégagés de la discussion ayant suivi les exposés susmentionnés :

Sous-type C du VIH-1

La souche dominante du VIH-1 au Canada est le sous-type B. Toutefois, le sous-type C est également présent au pays, à des taux relativement faibles en Colombie-Britannique, mais plus élevés au Québec (où l'on a examiné ce sous-type plus à fond). Le sous-type C présente un profil mutationnel différent du sous-type B. Toutefois, selon les données recueillies au Québec, le sous-type C semble développer une résistance aux INNTI plus tôt et à des concentrations plus faibles du médicament que le sous-type B.

Persistance des mutations de résistance à plusieurs médicaments

On a longuement discuté des données recueillies par le Québec sur la persistance des mutations de résistance à plusieurs médicaments sur une période de 5 ans. Si, comme il semble, le virus résistant à plusieurs médicaments est moins capable de se répliquer que le virus sauvage, on s'attendrait à ce que les mutations de résistance entraînent une réversion vers le type sauvage, qui supplanterait avec le temps le

virus multirésistant. Certains participants étaient d'avis qu'il serait utile que d'autres équipes de chercheurs confirment la stabilité de ces mutations, compte tenu des conséquences, au plan de la santé publique, d'une résistance primaire persistante aux médicaments. Malgré l'intérêt marqué pour les mutations de résistance à plusieurs médicaments, un participant a signalé qu'il ne fallait pas, au cours de l'atelier, perdre de vue l'importance des principales mutations de monorésistance.

Paradoxe de la capacité et de la persistance

Comme il a déjà été mentionné, les participants jugeaient étrange que des mutations conférant une multirésistance persistent, malgré le fait qu'un virus résistant à plusieurs médicaments soit moins capable de se répliquer qu'un virus sauvage. Un certain nombre de théories ont été avancées pour expliquer ce phénomène – on sait, par exemple, que l'acide nucléique du VIH peut être intégré à l'ADN humain et que les cellules réservoir, telles que les cellules mémoire T, peuvent demeurer viables pendant des décennies, mais il était clair qu'il fallait pousser plus loin la recherche pour parvenir à le comprendre.

Préoccupations en matière de santé publique

On discute un certain temps de l'impact des interruptions et reports de traitements antirétroviraux chez les personnes infectées par un virus résistant aux médicaments. Les interruptions et reports entraînent une expansion et une réémergence du virus sauvage. Les infections par le virus sauvage peuvent produire des charges virales plus grandes que les infections par un virus résistant, ce qui peut provoquer une hausse des taux de transmission du VIH, comme on a pu l'observer avant l'introduction de l'antirétrovirothérapie.

Toutefois, le report du traitement peut être moins critique que la nécessité de s'assurer qu'une fois envisagé, ce traitement convient au patient (ce qui peut supposer notamment un dépistage pharmacogénétique de polymorphismes pour le métabolisme et le transport des médicaments) et que le patient reçoit le suivi et le soutien nécessaires pour maintenir une pression médicamenteuse adéquate, de manière à prévenir un rebond de la charge virale et le développement de mutations.

Méthodes de laboratoire disponibles pour l'analyse de la résistance aux médicaments à des fins de surveillance

Technologies actuelles d'identification de la résistance aux médicaments

M. Tim Gleeson, Laboratoire national de la génétique du VIH, Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses, Santé Canada

Introduction

Deux méthodes sont couramment employées pour prédire et identifier la résistance microbienne : les tests de résistance phénotypique et les tests de résistance génotypique.

- Par résistance phénotypique, on entend les caractéristiques biologiques d'un organisme dans un environnement qui lui permettent de résister aux médicaments.
- Par résistance génotypique, on entend les marqueurs génétiques des caractéristiques biologiques qui confèrent la résistance.

Tests phénotypiques

Les tests phénotypiques mesurent la quantité de médicament requise pour inhiber la réplication du virus, comparativement à la souche sauvage. Ils sont effectués in vitro et donnent une mesure directe de la résistance. Deux sociétés ont mis au point des tests standardisés : Tibotec-Virco (récemment acquise par Johnson and Johnson) et Virologic. Ces tests peuvent permettre un grand débit. Des virus recombinants sont produits pour effectuer un tel test et ils incluent la région de la protéase, la majeure partie de la transcriptase inverse et une partie de *gag*.

Cependant, l'utilisation des tests phénotypiques comporte de sérieux inconvénients :

- il faut beaucoup de temps, de 2 à 6 semaines, pour obtenir les résultats;
- la composante main-d'œuvre est élevée, ce qui rend ces tests coûteux;
- la méthodologie employée peut produire des artefacts de laboratoire (le virus peut développer une résistance au cours du test);
- l'activité antivirale des INTI n'est pas la même au cours du test et *in vivo*;
- les changements dans le virus recombinant peuvent ne pas refléter fidèlement les changements dans le virus *in vivo*.

Tests génotypiques

Ces tests :

- sont basés sur le séquençage;
- sont relativement peu coûteux;
- ne nécessitent pas de confinement de biosécurité;
- mesurent indirectement la sensibilité aux médicaments;
- détectent les mutations à des niveaux considérés trop bas pour les tests phénotypiques.

Les tests génotypiques commerciaux peuvent être obtenus auprès d'un certain nombre de sources, dont les suivantes :

- Affymetrix (GeneChip)
- Innogenetics (Inno-LiPA)
- Visible Genetics (Trugene)
- Applied BioSystems (ViroSeq)
- Cependant, chacun de ces tests comporte certains inconvénients, qui sont décrits ci-dessous :

a. GeneChip

- nécessite une connaissance préalable du polymorphisme escompté;
- moins fiable que le séquençage nucléotidique pour la détection des mutations;
- incapable de détecter les insertions ou délétions;
- non fiable dans le séquençage des sous-types non-B sur un pavage basé sur le B.

b. Inno-LiPA

- ne peut détecter qu'un sous-ensemble de mutations de résistance aux médicaments;
- une proportion relativement élevée (10 %) des résultats ne peut être interprétée (mutations peu courantes à des points clés).

c. ViroSeq et Trugene

- matériel spécialisé requis pour effectuer le test (thermocycleurs, coulages de gels, séquenceurs spécifiques);
- un nombre limité de tests peuvent être traités au cours d'une période donnée;
- coût modéré.

Évaluation des tests de résistance génotypique aux médicaments

M. Richard Pilon, Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses, Santé Canada

Contexte

Les tests de résistance aux médicaments deviennent de plus en plus importants dans le traitement de l'infection à VIH, particulièrement avant le début d'une antirétrovirothérapie ou lors de la modification d'une thérapie en cours. Le développement d'une résistance aux médicaments peut entraîner un échec virologique. Un certain nombre d'études ont permis de constater que l'information sur les tests de résistance du VIH, en particulier sur les tests génotypiques, peut améliorer l'issue clinique. Il existe plusieurs méthodes pour évaluer la résistance aux médicaments anti-VIH, dont des tests basés sur le séquençage (ViroSeq, Trugene et méthodes internes), les tests d'hybridation (LiPA) et le phénotypage (tests en culture et *in vitro*).

Objectifs

L'étude a pour objectifs :

1. de créer un panel représentatif d'échantillons plasmatiques à partir de 100 patients infectés par le VIH-1, en les répartissant ainsi :
   - 40 patients prenant plus de trois antirétroviraux, avec échec virologique et une charge virale supérieure à 50 000 copies;
   - 40 patients prenant plus de trois antirétroviraux, avec échec virologique et une charge virale supérieure à 1 000 copies et inférieure à 10 000 copies;
   - 10 patients naïfs d'antirétroviraux, séropositifs pour le VIH depuis au moins 5 ans et avec une charge virale supérieure à 50 000 copies;
   - 10 patients naïfs d'antirétroviraux, séropositifs pour le VIH depuis au moins 5 ans et avec une charge virale supérieure à 1 000 copies et inférieure à 10 000 copies.
2. d'évaluer deux tests commerciaux (Perkin-Elmer et Visible Genetics) dans deux laboratoires différents, par rapport au séquençage interne de plusieurs clones dérivés de chaque échantillon (étalon de référence).
3. d'effectuer le phénotypage d'un sous-ensemble d'échantillons afin de comparer les résultats de tests génotypiques.
4. de mettre les constatations à profit dans l'élaboration de programmes de tests génotypiques pour le VIH.

L'étude ne portera que sur le sous-type B du VIH-1.

Voir à l'annexe B les schémas des méthodologies. Il existe des différences entre les méthodologies dans la façon de présenter ou d'évaluer les mutations :

- Le test de Perkin-Elmer dresse la liste de toutes les mutations qui se sont préalablement avérées liées à la résistance aux médicaments, sans interprétation des degrés probables de résistance ni indication du médicament ou de la classe de médicaments auxquels la mutation peut être liée. Il n'établit pas de distinctions entre les mutations primaires et secondaires.
- Le test de Visible Genetics dresse la liste des résistances relatives à un panel de médicaments, ainsi que des mutations, avec description de leur impact, à partir de l'information d'une base de données.
- Dans le cas du séquençage interne de clones, plusieurs sources (bases de données) fondées sur des références sont disponibles en ligne pour évaluer la résistance aux différents médicaments actuellement offerts.

Situation actuelle

Jusqu'ici, 32 échantillons ont été prélevés. Santé Canada les a soumis aux tests de Visible Genetics et de Perkin-Elmer. Retenant 20 échantillons, on a préparé six clones pour chacun. Les comparaisons n'ont pas encore été effectuées, et les laboratoires demeurent aveugles aux informations concernant les échantillons, pour éviter les biais dans l'analyse.

Résultats préliminaires de l'étude

Jusqu'ici, l'équipe de Santé Canada a obtenu les résultats suivants :

- On a relevé 10 échantillons présentant un degré élevé de résistance à toutes les classes d'antirétroviraux disponibles – les ITI et IP.
- Deux échantillons présentant une résistance aux ITI, un présentant une résistance multimédicamenteuse aux ITI et trois présentant une résistance aux IP ont été identifiés.
- 14 échantillons ne présentant aucune mutation de résistance reconnue ont été identifiés.
- On a relevé quatre échecs avec le test de Visible Genetics et deux avec le test de Perkin-Elmer.

On s'attend à avoir recueilli tous les échantillons d'ici l'été 2002. Les trois méthodes fournissent de bonnes données de séquençage. L'information génotypique fournie par le test de Visible Genetics est plus complète que celle du test de Perkin-Elmer. Les séquences seront comparées à la fin de l'étude.

Comptes rendus des laboratoires provinciaux de santé publique

Alberta

M^me^ Linda Chui, Microbiology and Public Health Laboratory, University of Alberta Hospital

Les laboratoires de santé publique de l'Alberta effectuent depuis 1997 des tests moléculaires de détection du VIH. Les tests de résistance génotypique ont été introduits en 1999 et ils sont effectués par le British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS. Depuis 2001, ce service est administré à Edmonton.

Nombre de tests effectués à ce jour et nombre d'échecs :

- 1999 : 49 tests, 7 échecs (14,3 %)
- 2000 : 65 tests, 8 échecs (12,3 %)
- 2001 : 78 tests, 7 échecs (9,0 %)

En 2002, on a entrepris une étude de validation, comparant les résultats du laboratoire d'Edmonton et du British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS. À ce jour, dans 13 cas sur 15, on a observé une concordance entre les résultats du test Trugene et du test de Virco (voir les détails à l'annexe B).

L'étude se poursuit, mais elle est coûteuse et exige beaucoup de travail. Il pourrait être utile de mettre en commun les données sur les tests utilisés au pays.

Québec

D^r^ Hugues Charest, Laboratoire de santé publique du Québec;
M^me^ Micheline Fauvel, Laboratoire de santé publique du Québec

Le programme québécois de tests de résistance aux médicaments a été conçu à des fins de suivi clinique. Les trois laboratoires participants – le Laboratoire de santé publique du Québec, l'Hôpital général juif/Centre sida McGill et le Centre hospitalier de l'Université de Montréal – utilisent le test de Virco. Les laboratoires sont liés à une base de données centrale capable de produire des profils sommaires de la résistance aux médicaments (par sous-type de VIH-1, par nucléotide, par antirétroviral, etc.). Pour chaque test, on produit un antivirogramme de Virco qui indique le phénotype virtuel et fournit une interprétation des résultats au clinicien.

On peut demander un test de résistance dans les cas suivants :

- échec d'un premier traitement;
- échec d'un traitement subséquent;
- nouveau-né;
- grossesse;

- primo-infection à VIH;
- autres raisons.

Au mois de mars 2002, 459 tests avaient été effectués. Les motifs pour lesquels les tests sont effectués sont introduits dans la base de données après coup, et l'on dispose de cette information pour 378 tests :

- 68 tests ont été effectués à cause de l'échec d'un premier traitement.
- 165 tests ont été effectués à cause de l'échec d'un traitement subséquent.
- 21 tests ont été effectués sur des femmes enceintes.
- 16 tests ont été effectués pour une primo-infection à VIH (il reste à confirmer qu'il s'agissait effectivement d'infections récentes et non seulement de diagnostics récents).
- 30 tests ont été effectués pour d'autres raisons.
- Aucune raison n'a été fournie dans le cas de 78 tests.

À ce jour, 6,5 % des tests (30 sur 459) ont porté sur des sous-types non-B du VIH-1.

Manitoba

Dre Magdy Dawood, Laboratoire provincial Cadham

Les tests de résistance aux médicaments ont commencé à être offerts au Manitoba en 1999. Ces tests sont actuellement effectués par le British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS.

Depuis 1999, 267 tests ont été effectués pour 156 patients. Chez quinze patients (10 % de tous ceux qui ont été testés), le traitement est un échec et la charge virale est élevée, mais les résultats du test de résistance indiquent qu'ils sont sensibles aux antirétroviraux. On ne sait trop pourquoi; l'explication pourrait résider dans la pharmacocinétique des médicaments ou la non-observance du traitement. Le nombre des échantillons de patients présentant une charge virale élevée qui ne peuvent être typés s'établit à 15 (6 %).

Les résultats des tests génotypiques effectués sur 49 échantillons en 2001 ont été les suivants :

- INTI : 37 sensibles, 12 résistants;
- INNTI : 29 sensibles, 20 résistants;
- IP : 36 sensibles, 13 résistants.

Seize des patients en cause présentaient une résistance à une seule classe de médicaments, 13 présentaient une résistance à deux classes et un présentait une résistance aux trois classes. Dix-neuf patients se sont avérés sensibles aux trois classes de médicaments.

10 Discussion

Le contrôle de la qualité est extrêmement important dans le contexte des analyses moléculaires (il a été intégré aux programmes de tests de la résistance de la Colombie-Britannique et du Québec). Toutefois, il n'existe actuellement aucune norme de contrôle de la qualité. Il faudrait instaurer sans tarder un programme standard national de contrôle de la qualité applicable aux tests de résistance. Le Dr Schuurman a invité les laboratoires canadiens à participer au programme européen de contrôle de la qualité des tests de résistance (voir les détails à l'annexe B).

Les tests phénotypiques prennent plus de temps et sont plus coûteux que les tests génotypiques, et ils nécessitent en plus des installations du niveau de confinement 3. Ils ne devraient être utilisés qu'en présence de résultats ambigus à un test génotypique. Il faudrait mener des recherches fondamentales sur la résistance phénotypique des sous-types non-B du VIH-1.

Compte tenu de certains facteurs (le nombre peu élevé de tests effectués, le coût, etc.), il est peu probable que les laboratoires privés se précipiteront pour offrir des tests de résistance au Canada dans un avenir rapproché.

Méthodes standardisées d'identification des mutations utiles pour la surveillance de la résistance aux médicaments

11 Méthode adoptée par le Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses pour identifier les mutations de résistance aux médicaments anti-VIH à des fins de surveillance

M. Tim Gleeson, Laboratoire national de la génétique du VIH, Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses, Santé Canada

Les méthodes employées par le CPCMI pour identifier la résistance aux médicaments anti-VIH ont été décrites (voir les détails à l'annexe B). Le Laboratoire national de la génétique du VIH est en mesure de séquencer environ 48 échantillons par jour. L'utilisation de l'automate d'extraction NucliSens a accéléré et amélioré l'extraction de l'ARN. Les taches de sang séché employées dans le passé ne fournissent pas des résultats uniformes; on utilise maintenant des échantillons de plasma/sérum pour les tests.

1E Discussion

Quelles mutations faut-il surveiller?

La discussion porte sur la détermination des mutations de résistance qu'il convient de suivre dans le cadre d'un programme de surveillance. Les catégories de mutations suivantes sont proposées :

- les mutations primaires qui confèrent une résistance à un antirétroviral;
- les mutations primaires qui confèrent une résistance croisée à une classe d'antirétroviraux;
- les mutations secondaires qui, en présence d'autres mutations primaires, confèrent une résistance à un médicament anti-VIH;
- les mutations révélatrices d'un traitement médicamenteux antérieur;
- les mutations laissant supposer qu'un virus présentant une résistance primaire aux médicaments est partiellement redevenu sauvage en l'absence de traitement.

La question de l'importance des mutations secondaires a été soulevée plusieurs fois au cours de la discussion. Isolément, elles ne sont pas très importantes, mais elles s'accumulent sous la pression du traitement et elles peuvent, ainsi réunies, avoir un effet marqué sur l'efficacité de la thérapie. On a laissé entendre que des échantillons datant d'avant l'introduction des inhibiteurs de protéase pourraient fournir des

données de base pour l'identification des mutations secondaires associées à la résistance aux IP.

Normalisation et actualisation

On observe un degré élevé de concordance entre les séquences génétiques produites par les différentes trousses de détection génotypique, mais également un manque de normalisation au niveau de l'analyse ou des rapports. Par exemple, la mutation L63 est incluse dans le rapport de Visible Genetics, mais non dans le rapport de VirtualPhenotype. (Virco inclut la mutation dans l'analyse de VirtualPhenotype, mais a choisi de ne pas l'inclure dans le rapport.)

Plusieurs bases de données sont utilisées pour identifier les mutations de résistance aux médicaments, soit celles des organismes suivants :

- International AIDS Society (IAS)
- Los Alamos National Laboratory
- Université Stanford

Toutefois, ces trois bases de données ne renferment que les mutations de résistance actuellement connues pour être cliniquement pertinentes. Elles ne tiennent pas compte de la résistance qui pourrait découler de la combinaison de mutations secondaires.

Les Centers for Disease Control and Prevention des États-Unis proposent d'utiliser la liste des mutations primaires de l'IAS[4]. Un participant a mentionné que cette liste a au moins 1 an de retard sur les plus récentes connaissances. Il faudrait constamment mettre à jour la liste des mutations pertinentes.

Initiative conjointe proposée

Le Dr Schuurman présente une proposition d'initiative conjointe de l'Union européenne, des États-Unis et du Canada visant l'identification des indicateurs moléculaires de la transmission de la résistance (IMTR). Cette initiative aurait pour objectifs :

- de définir les critères consensuels liés à l'identification de la transmission de la résistance, dans une optique scientifique, clinique et épidémiologique;
- de mettre au point un algorithme qui permette l'analyse des séquences d'IMTR jugées significatives à des fins scientifiques, cliniques et épidémiologiques;
- de publier, diffuser et utiliser les critères et l'algorithme dans toutes les études futures sur la transmission de la résistance, afin de permettre la comparaison de leurs résultats;

4 D'Aquilo RT, Schapiro JM, Brun-Vezinet F. Update on drug resistance mutations in HIV-1. *Topics in HIV Medicine* 2001; 9(6): 21-23.

- de créer un logiciel accessible sur le Web qui permette d'identifier facilement les indicateurs moléculaires de la résistance dans les échantillons cliniques et soit utilisable dans toutes les études sur la transmission;
- de continuellement mettre à jour les critères et l'algorithme.

Le Dr Schuurman a présenté sous forme résumée les mutations qui devraient être considérées significatives du point de vue scientifique, clinique et épidémiologique, et il a proposé des définitions des indicateurs moléculaires primaires, secondaires et de réversion associés à la transmission de la résistance. Voir à l'annexe B les détails de l'initiative proposée.

Points convenus

Les participants à l'atelier n'ont pas réussi à aplanir toutes les difficultés liées à la définition des mutations de résistance aux fins de la surveillance épidémiologique. Ils ont cependant convenu qu'il importerait :

- de publier la liste des mutations utilisées dans les programmes et rapports de surveillance canadiens;
- de s'entretenir avec les partenaires internationaux des listes de mutations qu'ils utilisent dans leurs programmes et rapports de surveillance.

Ceci permettrait à tout le moins les comparaisons de données et contribuerait à réaliser un éventuel consensus sur les mutations à surveiller.

En outre, les participants ont convenu que le processus d'identification des mutations de résistance sur lesquelles exercer une surveillance épidémiologique devait être permanent et inclure les mutations nouvellement mises au jour par les recherches et la pratique clinique.

Aspects cliniques et stratégiques des tests de détection de la résistance aux médicaments anti-VIH

Aspects cliniques

Dr Andrew Badley, Division des maladies infectieuses, Hôpital d'Ottawa;
Dr Bill Cameron, Division des maladies infectieuses, Hôpital d'Ottawa;
Dr Dan Gregson, Infectious Diseases, Calgary Laboratory Services

Les spécialistes cliniciens s'entendaient pour dire que les tests de détection de la résistance aux médicaments ont actuellement peu d'utilité dans la pratique clinique. Lorsqu'un traitement échoue, les caractéristiques cliniques de la personne et la littérature qui existe sur les traitements disponibles sont plus importantes et utiles que les tests de résistance. Si la résistance primaire aux médicaments (transmission d'un virus résistant aux médicaments) devient plus prévalente, les cliniciens peuvent commencer à demander des analyses génotypiques pour les patients chez qui l'on a récemment diagnostiqué une infection à VIH, en vue de déterminer quel traitement antirétroviral prescrire. En pareil cas, il serait utile de savoir quelles mutations observées dans une région confèrent une résistance clinique aux médicaments. C'est un domaine dans lequel il faudrait approfondir les recherches.

Les tests de détection de la résistance aux médicaments ont également une valeur limitée dans les cas d'exposition professionnelle au VIH. La prophylaxie post-exposition, si elle est jugée indiquée, devrait commencer immédiatement. Les antécédents thérapeutiques (dont les antécédents de résistance aux médicaments ou de tests de détection de cette résistance) de la personne source peuvent aider à sélectionner ou modifier le régime médicamenteux pour la prophylaxie post-exposition, si l'on sait ou découvre que cette personne est séropositive pour le VIH. Une application rigoureuse des protocoles post-exposition peut éliminer le besoin d'ajustements lorsqu'on constate une résistance aux médicaments chez la personne source ou parmi la population locale.

Il faudrait établir une définition de la capacité virale qui soit plus utile dans le contexte clinique. On a laissé entendre que, du point de vue clinique, la capacité pathogénétique (entraînant une diminution de la numération des CD4+) est plus pertinente que la capacité réplicative (entraînant une augmentation de la charge virale).

14. Aspects stratégiques

David Hoe, Division des politiques, de la coordination et des programmes sur le VIH/sida, Santé Canada

Du point de vue stratégique, on peut supposer que la prévalence de la résistance aux médicaments augmentera vraisemblablement avec le temps et que la résistance primaire persistera dans le temps. Ceci soulève plusieurs questions en ce qui a trait aux politiques :

1. Quels seraient les effets de l'augmentation de la prévalence de virus résistants aux médicaments sur le fardeau économique de l'épidémie? Elle ferait vraisemblablement croître la complexité et le coût des soins.
2. Comment faudrait-il intégrer la prévalence de la résistance et de la résistance primaire dans les mesures de santé publique adoptées pour contrer l'épidémie de VIH? La prévention de la résistance aux médicaments et de la résistance primaire aux médicaments est clairement essentielle, et la population a le droit d'être informée de la prévalence d'un virus résistant aux médicaments. Les concepts du virus résistant aux médicaments et de son effet sur le traitement doivent être intégrés dans les mesures d'éducation et de prévention en santé publique et en milieu communautaire.
3. Comment pouvons-nous assurer l'égalité d'accès aux tests de résistance et aux soins connexes en modifiant notre intervention face à l'épidémie? L'accès peut être influencé par des facteurs géographiques : les tests sont effectués essentiellement dans les régions métropolitaines du Canada, de telle sorte que les populations rurales risquent d'être moins bien desservies. L'accès peut être influencé par le coût : les provinces et les territoires couvriront-ils tous le coût des tests de résistance (il a été mentionné qu'en Colombie-Britannique et au Québec, ces tests sont couverts par le régime provincial d'assurance-maladie). L'accès peut être influencé par d'autres facteurs socio-économiques : les disparités déjà observées dans le contexte de l'épidémie de VIH aux plans de la technologie, des connaissances et de la justice pourraient également être observées par rapport à la résistance aux médicaments.
4. Enfin, la collaboration entre les gouvernements fédéral et provinciaux/territoriaux ainsi que la normalisation nationale des tests de détection de la résistance seront importantes dans l'élaboration à long terme des politiques et programmes.

Dans le cadre de la discussion qui a suivi cet exposé, les participants ont signalé l'existence de disparités dans la capacité des médecins de famille d'interpréter les résultats des tests de résistance, ce qui met en lumière le besoin de politiques et programmes liés à la formation permanente des médecins ainsi que de « réseaux neuronaux » qui permettent aux cliniciens de se tenir au courant des progrès dans les domaines de l'épidémiologie, de la technologie et des traitements.

Sommaire

Le Dr Chris Archibald résume en ces points les délibérations de la journée, à la fin de l'atelier :

- Il reste à trancher des questions importantes ayant trait à l'importance des mutations de résistance aux médicaments et à la transmission de virus résistants aux médicaments.
- La situation change constamment dans ce domaine, au fur et à mesure que l'on acquiert des connaissances au sujet des mutations existantes et nouvelles. Il est nécessaire de se tenir au courant des dernières découvertes.
- Un virus résistant aux médicaments qui est transmis (résistance primaire) semble remarquablement stable dans le temps en l'absence d'antirétrovirothérapie, selon les données recueillies au Québec (étude sur la primo-infection) et en Ontario (étude Polaris). Il faudrait explorer plus en détail la signification de ces données.
- Il faudrait établir une corrélation entre l'interprétation des données sur la résistance et l'utilité clinique. L'identification des mutations cliniquement pertinentes constituera une tâche permanente pour les chercheurs.
- La détermination des mutations à inclure dans un programme de surveillance de la résistance est une étape cruciale. Quelle que soit l'issue des délibérations au Canada ou à l'échelle internationale, il faudra continuellement tenir la liste à jour, au fur et à mesure que se développeront les connaissances sur la résistance aux médicaments. Pour l'instant, il semble que cette liste devrait inclure à tout le moins les mutations primaires et certaines mutations secondaires.
- La comparabilité des données de surveillance de la résistance aux médicaments est tout à fait souhaitable, tant au Canada qu'à l'échelle internationale.
- Le contrôle de la qualité est très important dans le contexte des tests de détection de la résistance et il doit être mis en place.

Selon les participants à l'atelier, la prochaine étape de l'élaboration d'un programme de surveillance de la résistance aux médicaments au Canada devrait consister à prendre les mesures suivantes :

- le CPCMI, de concert avec ses partenaires, devrait publier régulièrement la liste des mutations qu'il inclut dans son programme de surveillance de la résistance aux médicaments;
- le CPCMI devrait continuer à consulter ses partenaires nationaux et internationaux au sujet de la définition et de l'identification des mutations de résistance, en vue de parvenir à un consensus sur celles qui doivent être surveillées.

Annexe A : Liste des participants invités

Alberta

Dr Dan Gregson
Médecin microbiologiste
Infectious Diseases
Calgary Laboratory Services
1638 -10th Ave SW
Calgary, AB T3C 0J5

Tél. : (403) 209-5309
Téléc. : (403) 209-5347

Mme Linda Chui
Scientifique de laboratoire et chef du programme moléculaire
University of Alberta Hospital
Microbiology and Public Health Laboratory
Walter McKenzie Centre, Room 1B2.18
University of Alberta Hospital
8440-112th Street
Edmonton, AB T6G 2J2

Tél. : (780)
Téléc. : (780) 407-8984
Courriel : L.Chui@provlab.ab.ca

Colombie-Britannique

M. Rick Galli
Coordonnateur des tests de résistance du VIH
BC Centre for Excellence in HIV/AIDS
613-1081 Burrard St.
Vancouver, BC V6Z 1Y6

Tél. : (604) 806-9145
Téléc. : (604) 806-8464
Courriel : rgalli@hivnet.ubc.ca

M. Darrel Cook
Gestionnaire des services de laboratoire
BC Centre for Disease Control
655 West 12th Avenue
Vancouver, BC V5Z 4R4

Tél. : (604) 660-6045
Téléc. : (604) 660-6073
Courriel : darrel.cook@bccdc.ca

Manitoba

Dre Magdy Dawood
Directeur, Direction des services de laboratoire et d'imagerie
Laboratoire provincial Cadham
C.P. 8450
1750, avenue William
Winnipeg (Manitoba) R3C 3Y1

Tél. : (204) 945-7545
Téléc. : (204) 786-4770
Courriel : MDawood@gov.mb.ca

Ontario

Dr Bill Cameron
Hôpital d'Ottawa
Campus Général
Division des maladies infectieuses
501, chemin Smyth, pièce G12
Ottawa (Ontario) K1H 8L6

Tél. : (613) 737-8880
Téléc. : (613) 737-8925
Courriel : bcameron@ottawahospital.on.ca

Dr Andrew Badley
Professeur adjoint, Division des maladies infectieuses
Hôpital d'Ottawa, Campus Général
501, chemin Smyth
Ottawa (Ontario) K1H 8L6

Tél. : (613) 737-8998
Téléc. : (613) 737-8682
Courriel : abadley@ohri.ca

Québec

Mme Micheline Fauvel
Directrice adjointe
Laboratoire de santé publique du Québec
20045, chemin Sainte-Marie
Sainte-Anne-de-Bellevue (Québec)
H9X 3R5

Tél. : (514) 457-2070
Téléc. : (514) 457-6346
Courriel : mfauvel@lspq.org

Hughes Charest
Biologiste moléculaire
Laboratoire de santé publique du Québec
20045, chemin Sainte-Marie
Sainte-Anne-de-Bellevue (Québec)
H9X 3R5

Tél. : (514) 457-2070, poste 239
Téléc. : (514) 457-7292
Courriel : hcharest@lspq.org

Dr Bruno Turmel
Médecin conseil
Responsable du programme de surveillance du sida au Québec
Direction générale de la santé publique
Ministère de la Santé et des Services sociaux
201, boulevard Crémazie est, bureau 2.03
Montréal (Québec) H2M 1L2

Tél. : (514) 873-1264
Téléc. : (514) 864-2778
Courriel : bruno.turmel@msss.gouv.qc.ca

Dre Bluma Brenner
Coordonnatrice des tests de résistance aux médicaments
Centre sida McGill, pièce 326
Institut Lady Davis
3755, ch. de la Côte Sainte-Catherine
Montréal (Québec) H3T 1E2

Tél. : (514) 340-8260 poste 5261
Téléc. : (514) 340-7537
Courriel : bluma.brenner@mcgill.ca

Mme Bonnie Spira
Gestionnaire des laboratoires du VIH
Centre sida McGill
Institut Lady Davis
Hôpital général juif
3755, ch. de la Côte Sainte-Catherine
Montréal (Québec) H3T 1E2

Tél. : (514) 340 8260 poste 5302
Téléc. : (514) 340 7537
Courriel : bonnie.spira@mcgill.ca

Saskatchewan

Dr Edward Chan
Directeur clinique
Provincial Laboratory
Saskatchewan Health
3211 Albert Street
Regina (Saskatchewan) S4P 5W6

Tél. : (306) 787-3135
Téléc. : (306) 787-1525
Courriel : echan@health.gov.sk.ca

Santé Canada

Dr Donald Sutherland
Directeur
Bureau du VIH/sida, des MTS et de la tuberculose
Immeuble Brooke Claxton
Pré Tunney, I.A. : 0900B1
Ottawa (Ontario) K1A 0L2

Tél. : (613) 957-1777
Téléc. : (613) 946-0244
Courriel : don_sutherland@hc-sc.gc.ca

Dr Paul Sandstrom
Directeur associé
Laboratoires nationaux du VIH/sida
Immeuble du LLCM, pièce 3252
Pré Tunney, I.A. : 0603B3
Ottawa (Ontario) K1A 0L2

Tél. : (613) 957-0172
Téléc. : (613) 957-7258
Courriel : paul_sandstrom@hc-sc.gc.ca

Dr Chris Archibald
Chef
Division de l'épidémiologie et de la surveillance du VIH/sida
Bureau du VIH/sida, des MTS et de la tuberculose
Immeuble Brooke Claxton, pièce 0108B
Pré Tunney, I.A. : 0900B1
Ottawa (Ontario) K1A 0L2

Tél. : (613) 941-3155
Téléc. : (613) 946-8695
Courriel : chris_archibald@hc-sc.gc.ca

M. Tim Gleeson
Biologiste
Laboratoire national de la génétique du VIH
Bureau VIH/sida, des MTS et de la tuberculose
Immeuble du LLCM, 3e étage
Pré Tunney, I.A. : 0603A1
Ottawa (Ontario) K1A 0L2

Tél. : (613) 952-9778
Téléc. : (613) 957-1163
Courriel : tim_gleeson@hc-sc.gc.ca

Dre Gayatri Jayaraman
Epidémiologiste principle
3030 Hospital Dr. NW
Calgary, AB T2N 4W4

Tél. : (403) 944-2493
Téléc. : (403) 283-0142
Courriel : gayatri_jayaraman@hc-sc.gc.ca

M. Richard Pilon
Technologue de recherche
Bureau du VIH/sida, des MTS et de la tuberculose
Immeuble du LLCM, pièce 3170
Pré Tunney, I.A. : 0603B3
Ottawa (Ontario) K1A 0L2

Tél. : (613) 954-1278
Téléc. : (613) 957-1163
Courriel : richard_pilon@hc-sc.gc.ca

Dr Tig Shafto
Agent de surveillance principal
Division de la surveillance des rétrovirus
Bureau du VIH/sida, des MTS et de la tuberculose
Immeuble Brooke Claxton, pièce 0108B
Pré Tunney, I.A. : 0900B1
Ottawa (Ontario) K1A 0L2

Tél. : (613) 941-2147
Téléc. : (613) 957-2842
Courriel : tig_shafto@hc-sc.gc.ca

M. Bruce Tudin
Agent de surveillance
Division de l'épidémiologie et de la surveillance du VIH/sida
Bureau du VIH/sida, des MTS et de la tuberculose
Immeuble Brooke Claxton, pièce 0108B
Pré Tunney, I.A. : 0900B1
Ottawa (Ontario) K1A 0L2

Tél. : (613) 954-5168
Téléc. : (613) 946-8695
Courriel : bruce_tudin@hc-sc.gc.ca

M. David Hoe
Gestionnaire
Unité d'élaboration des politiques
Division des politiques, de la coordination et des programmes sur le VIH/sida
Immeuble Jeanne-Mance, 18e étage
Pré Tunney, I.A. : 1918B1
Ottawa (Ontario) K1A 0K9

Tél. : (613) 954-1008
Téléc. : (613) 952-3556
Courriel : david_hoe@hc-sc.gc.ca

Dr Brian Foster
Conseiller scientifique principal
Bureau des politiques et de la coordination
Direction générale des produits de santé et des aliments
Immeuble Holland Cross, tour B
Pièce 2092, pré Tunney, I.A. : 3102C3
Ottawa (Ontario) K1A 1B6

Tél. : (613) 957-3506
Téléc. : (613) 941-5035
Courriel : brian_foster@hc-sc.gc.ca

Mme Marilyn Davis
Soutien scientifique
Bureau de la science
Bureau des politiques et de la coordination
Direction des produits thérapeutiques
Holland Cross, tour B, pièce 2089
1600, rue Scott
Ottawa (Ontario) K1A 1B6

Tél. : (613) 951-6260
Téléc. : (613) 941-5035
Courriel : marilyn_davis@hc-sc.gc.ca

Représentante communautaire

Mme Jessica Daniels
Conseillère nationale en matière de programmes
Société canadienne du sida
4e étage, 309, rue Cooper
Ottawa (Ontario) K2P 0G5

Tél. : (613) 230-3580 poste 141
Téléc. : (613) 563-4998
Courriel : jessicad@cdnaids.ca

Invité de l'étranger

Dr Rob Schuurman
Virologiste moléculaire
University Medical Center Utrecht
Department of Virology (G04-615)
Heidelberglaan 100
3584 CX Utrecht
The Netherlands

Tél. : +31 30 250 6526
Téléc. : +31 30 250 5426
Courriel : rob.schuurman@lab.azu.nl

Rapporteurs

M. Sean Hosein
21 Westmoreland Avenue
Toronto (Ontario) M6H 2Z6

Tél. : (416) 516-9929
Courriel : srhosein@sympatico.ca

Dr Theodore de Bruyn
408, avenue Riverdale
Ottawa (Ontario) K1S 1S2

Tél. : (613) 730-7841
Téléc. : (613) 730-0782
Courriel : tdebruyn@cyberus.ca

Annexe B : Exposés

Surveillance de la résistance primaire aux médicaments

1 Prévalence et déterminants de la résistance primaire aux médicaments au Canada

Dre Gaya Jayaraman, Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses, Santé Canada

Diapositive 1

Prévalence et déterminants de la pharmacorésistance primaire au Canada

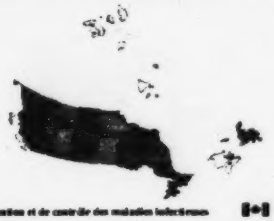
Gaya Jayaraman
Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses
Santé Canada

Atelier sur la pharmacorésistance du VIH
21 mars 2002

Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses

Diapositive 2

Programme canadien de surveillance des souches et de la résistance aux médicaments ayant trait au VIH (PCSSRMV) - Partenaires



Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses

Diapositive 3

Programme canadien de surveillance des souches et de la résistance aux médicaments ayant trait au VIH - Partenaires

- Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses, Santé Canada
- BC Centre for Disease Control
- Alberta Health and Wellness, Provincial Laboratory for Public Health, University of Alberta et University of Calgary
- Saskatchewan Health
- Ministère de la Santé du Manitoba
- Laboratoire de santé publique de l'Ontario
- Newfoundland Public Health Laboratory, Department of Health and Community Services

Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses

Diapositive 4

Objectifs du PCSSRMV

Évaluer les marqueurs génétiques de la pharmacorésistance primaire aux antirétroviraux

Pharmacorésistance primaire : résistance accrue aux antirétroviraux observée chez les personnes qui n'ont jamais été traitées auparavant et qui sont donc vraisemblablement infectées par une souche pharmacorésistante du VIH.

Pharmacorésistance secondaire : résistance accrue à des médicaments observée chez des personnes qui suivent déjà un traitement (à cause vraisemblablement d'un échec thérapeutique)

Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses

Diapositive 5

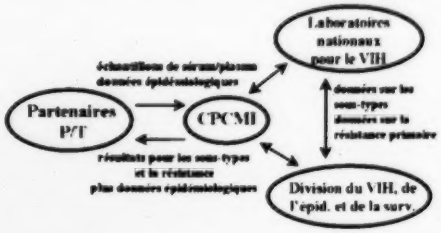
Répercussions en santé publique de la surveillance de la pharmacorésistance primaire dans la population

- Suivre la prévalence de la pharmacorésistance primaire afin de formuler des recommandations à l'intention de la population concernant le traitement initial (en particulier pour les femmes enceintes et dans le cadre d'un PEP)
- Utilisation de la transmission de souches pharmaco-résistantes de VIH comme indicateur pour évaluer les programmes de prévention et orienter l'élaboration de politiques

Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses

Diapositive 6

Collecte, analyse et transfert de données



Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses

Diapositive 7

Analyse de la séquence *pol*

- **Aligner la séquence et la comparer avec une souche précoce de virus de type sauvage HXB2 (avant traitement aux ART)**
- **Identifier les mutations en utilisant le consensus de Stanford et les buses de données sur la pharmacorésistance du VIH du LANL**

Mutation « primaire » : mutation dans la séquence virale, qui en elle-même est étroitement associée à une pharmacorésistance

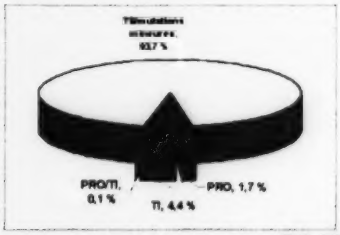
Mutation « secondaire » : mutation dans la séquence virale qui, en association avec d'autres mutations, est liée à la pharmaco-résistance

Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses

Diapositive 8

Pharmacorésistance primaire du VIH-1

(N = 706)



Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses

Diapositive 9

Mutations primaires dans la TI

Médicament antirétroviral	Nbre de sujets (%) N=706	Mutations primaires
ITI, Total	**31 (4,4)**	
AZT	14 (2)	M41L
AZT	1 (0,1)	K70R
ddC	3 (0,4)	T69D/N
AZT/ddC	1 (0,1)	M41L/T69N
AZT/ddC	1 (0,1)	K70R/T69N
Adefovir	1 (0,1)	K70E
3TC/Abacavir/Adefovir	4 (0,6)	M184V
AZT/3TC/Abacavir/Adefovir	1 (0,1)	M184V/T215Y
Foscarnet	1 (0,1)	H208Y
DLV, NVP, EFV	1 (0,1)	K103N
DLV, NVP, EFV, NRTI, FTC	2 (0,3)	K103N/Q151M
NVP	1 (0,1)	G190A/E/S

Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses

Diapositive 10

Mutations primaires dans la protéase

Médicament antirétroviral	Nbre de sujets (%) N=706	Mutations primaires
IP, Total	**12 (1,7)**	
Ritonavir	5 (0,7)	M46I
Amprenavir	1 (0,1)	I50V
Indinavir/Ritonavir	1 (0,1)	V82A
Nelfinavir	2 (0,3)	N88D
Nelfinavir	3 (0,4)	L90M

Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses

Diapositive 11

Caractéristiques des personnes porteuses de mutations primaires

- Adultes des deux sexes
- Âges – 16 à 69 ans (majorité entre 15 et 39 ans)
- Principaux facteurs de risque – rapports sexuels entre hommes, utilisation de drogues injectables, contacts heterosexuels
- Issus de la plupart des groupes ethniques (Blancs, Noirs, Asiatiques, Autochtones)
- Infection par les sous-types A, B et C du VIH-1
- Prévalence devrait probablement augmenter avec le temps
- Présence détectée un peu partout au Canada

(C -B., Alb., Sask., Man., Ont., Qc)

Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses

Diapositive 12

Conclusions préliminaires : pharmacorésistance primaire du VIH-1

- Données démontrant une résistance primaire aux ITI et aux IP.
- Virus résistant à la fois aux ITI et aux IP retrouvé chez au moins un patient n'ayant jamais été traité.
- La prévalence de souches de VIH-1 porteuses de mutations primaires de résistance est de 6,3 % (ITI, 4,4 %; IP, 1,7 %; ITI/IP, 0,1 %)
- Des mutations primaires de résistance ont été détectées chez des sujets de différents âges, types d'exposition à risque, groupes ethniques, provinces ainsi que dans des sous-types non-B du VIH-1

Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses

Diapositive 13

Points à considérer

- Problèmes techniques non résolus dans la détection de la pharmacorésistance
  - qualité de l'échantillon
  - capacité d'identifier les mutations dans les sous-espèces minoritaires
  - capacité d'identifier les mutations dans les sous-types non-B
  - quelles mutations sont importantes?
  - absence d'uniformisation
  - intérêt sur le plan clinique ou sur le plan de la santé publique
- Lacunes dans les données épidémiologiques (facteurs de risque, groupe ethnique, année du premier résultat positif, antécédents thérapeutiques)
- Les données ne représentent que les sujets qui sont infectés, ont subi un test et présentent une mutation « stable »

Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses

Diapositive 14

Orientations futures

- Prélever des sérums et recueillir des données épidémiologiques sur TOUS les nouveaux cas diagnostiqués d'infection à VIH afin d'accroître la représentativité
- Utiliser les évaluations de l'incidence afin de surveiller les tendances dans les infections « récentes »
- Analyse phylogénétique basée sur une population afin d'évaluer les profils de transmission
- Étendre le corpus de données pour inclure les autres provinces et territoires
- Assurer la liaison avec les intervenants à l'échelle nationale pour influencer les programmes et politiques de prévention et de traitement
- S'associer avec d'autres organisations internationales pour surveiller les tendances à l'échelle mondiale

Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses

Diapositive 15

Mutations associées à une forte résistance (en date de décembre 2001)

- Dresser la liste des inhibiteurs de protéase :

PCSSRMP	BD de Stanford	IAS - U	ART
D30N	oui	oui	NFV
M46I/L	oui	oui	INV
I47V	non	non	APV
G48V	oui	oui	SQV
I50V	oui	oui	APV
V82A/F/S/T	oui	oui	IDV, RTV
I84V	oui	oui	APV, IDV, RTV
N88D	non	non	NFV
L90M	oui	oui	NFV, SQV

Diapositive 16

Mutations associées à une forte résistance (en date de décembre 2001)

- Dresser la liste des inhibiteurs nucléosidiques de la TI :

PCSSRMP	BD de Stanford	IAS - U	ART
M41L	oui	oui	AZT
I99V	non	non	d4T
K65R	oui	oui	ddC, ddI, TDF, Abacavir
D67N	oui	non	AZT
T69D	oui	non	ddC
K70R	oui	non	AZT
K74V	oui	oui	ddI, ddC, Abacavir
V75T	non	oui	d4T, ddI
G151M	non	non	AZT, ddC, ddI, d4T, 3TC, Abacavir
M184V/I	oui	oui	3TC, ddC, ddI, Abacavir
L210W	oui	non	AZT, d4T, Abacavir
T215F/Y	oui	oui	AZT, d4T Abacavir
T219Q/E	oui	non	AZT, d4T, Abacavir

Diapositive 17

Mutations associées à une forte résistance (en date de décembre 2001)

➢ Dresser la liste des inhibiteurs non nucléosidiques de la TI :

PCSSRMP	BD de Stanford	IAS - IJ	ART
L100I	oui	oui	DLV, EFV
K103T	non	non	DLV
K103N	oui	oui	DLV, NVP, EFV
V106A	oui	oui	NVP
V108I	oui	non	NVP, EFV
Y181C/I	oui	non	DLV, NVP, EFV
Y188C/L/G	oui	non	NVP, EFV
G190S/A	oui	non	NVP, EFV
P225H	oui	non	EFV
M230L	oui	oui	DLV, NVP
P236L	oui	oui	DLV

Diapositive 18

Qu'en est-il des « révertants »?

P. ex. : T215D/C

- situé au site de mutations associées à une forte résistance aux ART (T215Y/F)
- sensible à un médicament (AZT), se réplique de façon efficiente
- résulte d'une réversion partielle au TS en l'absence de pression sélective : Y → D/C → T

Répercussions sur le plan clinique et sur le plan de la santé publique :

- résulte d'une infection par une souche pharmacorésistante porteuse d'une mutation associée à une forte résistance aux ART
- peut nuire à l'efficacité des ART

British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS : Tendances récentes et défis associés aux tests de résistance aux médicaments anti-VIH

M. Rick Galli, British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS

Diapositive 1

Tendances récentes et défis relativement aux tests de détection de la pharmacorésistance du VIH

British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS

Rick Galli

Diapositive 2

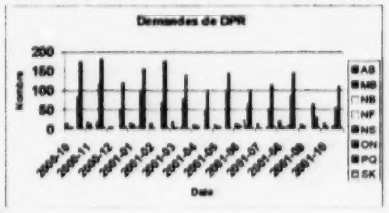
Renseignements de base sur le programme de dépistage de la pharmacorésistance du VIH de notre Centre d'excellence

- Le Centre a commencé à mettre au point des méthodes de génotypage faisant appel au séquençage en 1997.
- Une collaboration a été établie avec Virco pour l'accès à la base de données Virtual Phenotype.
- Nous fonctionnons comme un service clinique de la C.-B. depuis avril 1999.
- C'est le premier centre au Canada à offrir un dépistage de la pharmacorésistance comme service clinique; depuis mai 1999, le service a été étendu à d'autres provinces.
- Jusqu'à présent, environ 8 500 tests (1 500 patients) de la C.-B.; 7 000 tests du reste du Canada.

Diapositive 3

Demandes de DPR, d'ailleurs au Canada

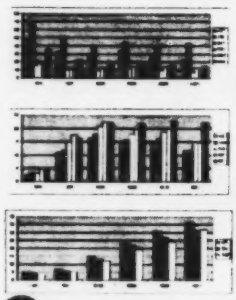
- Depuis 2001-2002, dépistage pour l'Ontario, le Manitoba, le sud de l'Alberta, la Nouvelle-Écosse et le Nouveau-Brunswick.



Diapositive 4

Tendances temporelles dans la pharmacorésistance du VIH en C.-B.

Diapositive 5



Tendances relatives aux INTI

La résistance à l'abacavir est plus forte en 1998–1997 mais son usage n'est généralisé que depuis 1999⁴ (résistance croisée)

Tendances relatives aux IP

La résistance au nelfinavir demeure toujours plus élevée que pour le reste des médicaments en raison d'une augmentation de la prévalence de la mutation D30N

Tendances relatives aux INNTI

L'augmentation de la prévalence avec le temps de la mutation K103N a entraîné à elle seule une résistance assez large à la classe des INNTI

Diapositive 6

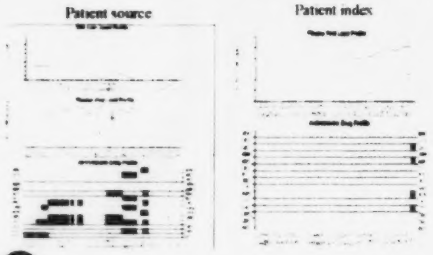
Résistance primaire

Diapositive 7

Etude de cas de resistance primaire

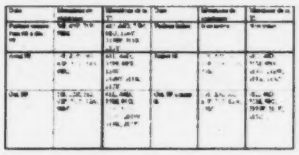
Patient source

Patient index



Diapositive 8

Persistance de la resistance et des mutations de la TI en l'absence de traitement



Diapositive 9

Prévalence et implications cliniques des insertions dans la region N-terminal p6^{Gag} du VIH chez les patients naïfs amorçant un traitement aux antirétroviraux

- Insertions dans p6^{Gag} observées chez jusqu'à 21 % des patients naïfs aux INTI, mais chez seulement 5 % des patients naïfs (Peters et al. J. Virol. 2001)
- Associée à une augmentation de l'infectivité et au développement d'une insertion
- Augmentation de la fréquence de p6^{Gag} dans la primo-infection qui a coïncidé avec la hausse de l'incidence de l'infection par une souche de VIH pharmacorésistante (Smith et al. CROI 2002)

- Dans la cohorte native de la C.-B., n = 431, prévalence de p6^{Gag} est de 14,8 %
- Associée de façon significative avec un plus grand nombre de pVL et un moins grand nombre de lymphocytes CD4 au départ
- Non associée à une résistance initiale aux antirétroviraux

Diapositive 10

Variabilité des tests de détection de la pharmacorésistance du VIH faisant appel au séquençage

Diapositive 11

Variabilité des tests « maison » de détection de la pharmacorésistance du VIH

Concordance Ns	99.4 %	99.6 %, 99.8 %	99.9 %, 99.9 %	>99.9 %
Total Ns	68 882	68 882, 68 882	68 882, 68 882	68 882
Différences Ns	440	127, 120	92, 100	70
Ns partiel	330 (75 %)	125 (99.4 %), 118 (99.3 %)	89 (96.7 %), 98 (98 %)	68 (97.1 %)
Concordance As	99.3 %	99.8 %, 99.8 %	99.8 %, 99.9 %	99.5 %
Total As	22 954	22 954, 22 954	22 954, 22 954	22 954
Différences As	170	51, 46	45, 56	27
As partiel	130 (76.4 %)	50 (98 %), 43 (93.5 %)	39 (86.7 %), 56 (100 %)	27 (100 %)

Diapositive 12

Variation d'un centre à l'autre: comparaison des méthodes

Programme pilote d'évaluation externe de la qualité, C. R./Québec

VGI Trugene versus méthodes de génotypage du Centre d'excellence, n = 73

n=73

Total NA 19 481

Concordance NA 99.1 %

Différences NA 169

Différences partielles 162

Mutations résist. C -B100 Qc 101

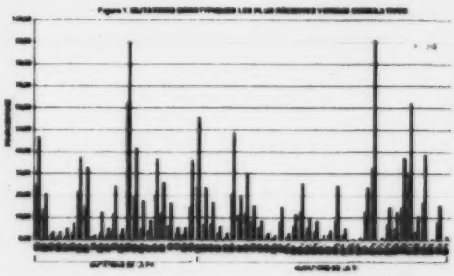
Ecarts 3(Aucun scientifique n'a)

Diapositive 13

Implications cliniques des tests de détection de la pharmacorésistance du VIH

Diapositive 14

Réversion des mutations de résistance



Diapositive 15

Défis de la standardisation de la surveillance de la pharmacorésistance

- « 16 ont choisi 3 » combinaisons de médicaments.
- > 240 mutations associées à la résistance.
- Réversion des mutations avec le temps.
- D'après les règles c. phénotype virtuel.
- Adhésion

Lorsqu'on les répartit en catégories, les données sont trop peu nombreuses pour qu'on puisse dégager des tendances ou une signification.

Diapositive 16

« Résistance avec réponse » Initiatives concertées de collecte de données

- RDI - Toronto
- Forum for Collaborative Research - Washington, DC

Tous ceux qui possèdent des données sur la résistance couplées à des données sur la reponse au traitement peuvent contribuer.

Étude Polaris : Transmission de souches du VIH-1 résistantes aux médicaments en Ontario

M. Richard Pilon, Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses, Santé Canada, pour le compte du groupe de l'étude Polaris

Diapositive 1

POLARIS

Transmission du VIH-1 pharmacorésistant en Ontario

Richard Pilon
Paul Sandstrom
et le Groupe d'étude Polaris

Diapositive 2

Étude Polaris

L'étude Polaris est une étude d'observation étalée sur 5 ans portant sur une cohorte bien définie de personnes qui ont contracté récemment une infection à VIH.

Diapositive 3

Objectifs de l'étude Polaris

- Déterminer pourquoi/comment les patients deviennent infectés (aspects sociaux, épidémiologiques).
- Caractériser le virus infectant.
- Déterminer le taux de transmission du VIH pharmacorésistant en Ontario.
- Surveiller les changements dans la pharmacorésistance avec le temps.
- Établir des liens entre les résultats obtenus et la progression de la maladie.

Diapositive 4

Recrutement des patients

- Tests centralisés effectués au Laboratoire central de santé publique de l'Ontario.
- 1 000 nouvelles infections par année en Ontario.
- Bon nombre d'entre elles chez des personnes ayant déjà obtenu des résultats négatifs aux tests.

Diapositive 5

Critères d'admissibilité

- Obtention d'un résultat positif au test de détection du VIH dans les 12 mois précédents et un résultat négatif dans les 2 années précédant le premier résultat positif.

ou

- Obtention d'un résultat indéterminé au test de détection du VIH après un test positif dans les 12 mois précédents.

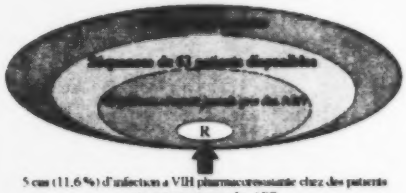
Diapositive 6

Cohorte Polaris

- Les patients passent une entrevue approfondie de recrutement visant à recueillir des données sociales et épidémiologiques (risque, raison du test, symptômes).
- Les échantillons de plasma et les données cliniques sont recueillies au départ et tous les 6 mois pendant 5 ans.
- Depuis 1998, plus de 100 patients ont été recrutés; moins de 5 % par année ont abandonné l'étude.

Diapositive 7

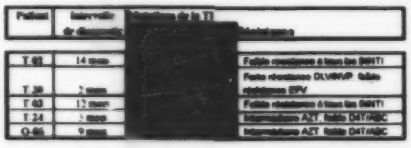
Résultats



5 cas (11,6 %) d'infection à VIH pharmacorésistante chez des patients n'ayant jamais pris des ART
Résistance dans tous les cas à des inhibiteurs de la transcriptase inverse (TI)
Aucune résistance aux inhibiteurs de protéase (IP)

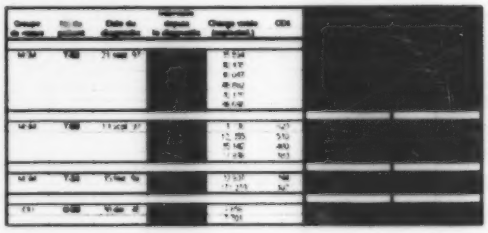
Diapositive 8

Mutations résistantes transmises chez les personnes n'ayant jamais pris des ART



Diapositive 9

Persistance de variants de la résistance



Diapositive 10

Vitalité des variants de résistance transmis

- Il a été démontré que V179D et V106A réduisent la capacité de réplication.
- Une étude sur M41L a indiqué que ces variants avaient une vitalité de type sauvage.

Diapositive 11

Conclusions

- On observe une transmission de souches de VIH pharmacorésistantes (11.6 %).
- Les virus résistants transmis persistent en l'absence de traitement antirétroviral pendant une période pouvant atteindre 4 ans après le diagnostic de l'infection à VIH
- D'autres études doivent être effectuées sur les personnes infectées par une souche de VIH pharmacorésistante

Health Canada Santé Canada

Diapositive 12

Remerciements

Université de Natal

Sharon Cassol

Laboratoire central de santé publique de l'Ontario

Carol Major
Carol Swantee

Université d'Ottawa

Michelle James

Laboratoire national de la génétique du VIH

Tim Gleeson
Rick Barrette
Isabelle Lemieux

Groupe d'étude Polaris

Liviana Calzavara
Ann Burchell
Wendy Medved
Stan Read
Ken Logue
Kevin Gough
Anita Rachlis

Financé par des subventions du PNRDS/RSC de Santé Canada et du Bureau du SIDA, ministère de la Santé de l'Ontario

Health Canada Santé Canada

4 Résistance à plusieurs médicaments dans l'étude du Québec sur la primo-infection à VIH-1

Dre Bluma G. Brenner, Centre sida McGill, Université McGill

Diapositive 1

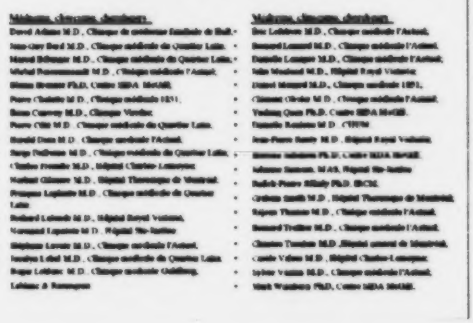
Multirésistance au Québec Primo–infection par le VIH–1

- Mark A. Wainberg
- Bluma G. Brenner
- Bonnie Spira
- Jean-Pierre Routy
- Rafick Sekaly
- Brian Conway

- Daniela Moisi
- Maureen Oliveira
- Mervi DeTorio

Diapositive 2

Collaborateurs- FRSQ

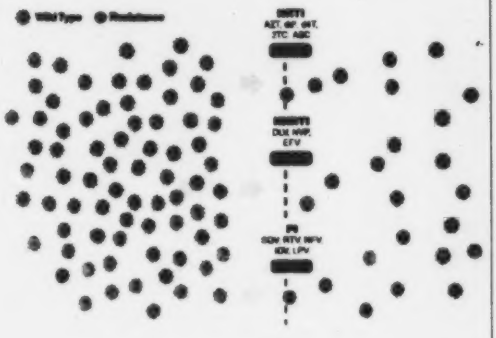


Diapositive 3

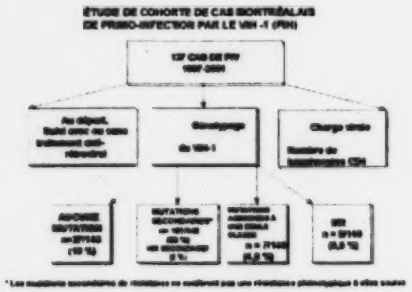
Objectifs d'étude

- Prévalence de la pharmacorésistance dans les cas de primo-infection par le VIH–1
- Évolution génotypique dans le temps des infections multirésistantes
- Impact de l'infection multirésistante sur la virémie et le nombre de lymphocytes CD4
- Vitalité des virus multirésistants par rapport aux virus sauvages

Diapositive 4



Diapositive 5



Diapositive 6

Prévalence comparée de souches résistantes (1)

	Montréal n=146 1997-01	Genève n=82 1996-98	New-York n=80 1995-99	Californie n=141 1989-98
Mutateurs de la TI	25 %	10,0 %	16,3 %	
MR (Double ou triple)	5,5 %	1,3 %	3,8 %	2,1 %
INTI	8,9 %		12,5 %	
AZT/TAM-215Y/F	3,8 %	9,0 %	7,5 %	
3TC-184V	3,4 %	2,4 %	5,0 %	2,1 %

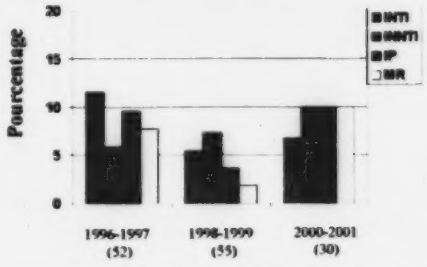
Diapositive 7

Prévalence comparée de souches résistantes

	Montréal n=144 1997-02	Genève n=82 1996-98	New-York n=80 1995-99	Californie n=141 1989-98
Inhibiteur protéase	74 %			
PI primaire (90 82,84	5,5 % 2,7 % 4,8 %	1,4 %	2,5 %	--
INNTI	4,2 %	1,0 %	8,8 %	0,7 %
103	1,4 %	--	1,3 %	--
Non-B	1,4 %			

Diapositive 8

Prévalence de la résistance phénotypique



Diapositive 9

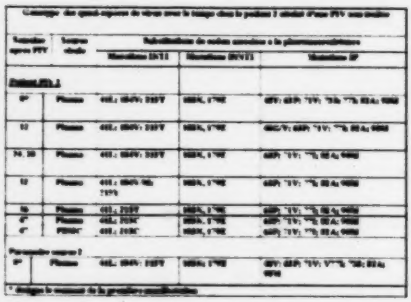
TABLEAU 1. Transmission de la multirésistance dans la primo-infection par le VIH-1

Patient	Substitutions de codon associées à la pharmacorésistance		
	Mutations INTI	Mutations INNTI	Mutations IP
1	41L; 67N; 69N; 70R; 74V; 184V; 215F; 219Q	190; 103N	10I; 36I; 54V; 63P; 71V; 73S; 82V; 90M
2	41L; 184V; 215Y	103N, 179E	48V; 63P; 71V; 73S; 77I; 82A; 90M
3	Aucune	103N	10I; 54V; 63P; 71V; 82T; 84V; 90M
4	184V; 215Y	103N	77I
5	184V	190	20R, 77I
6	41L; 67N; 219W; 215Y	Aucune	63P; 71V; 73S; 90M
7	41L; 215Y	101E	Aucune
8	41L; 215Y	101E	Aucune

Diapositive 10

LES INFECTIONS MULTIRÉSISTANTES PERSISTENT AVEC LE TEMPS

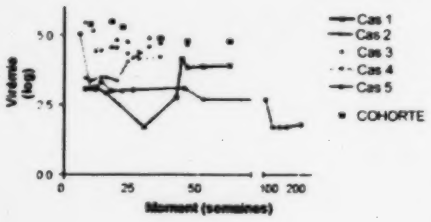
Diapositive 11



Diapositive 12

Les infections multirésistantes peuvent induire une faible virémie

Diapositive 13

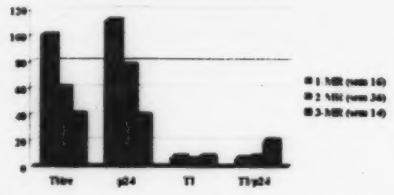


Diapositive 14

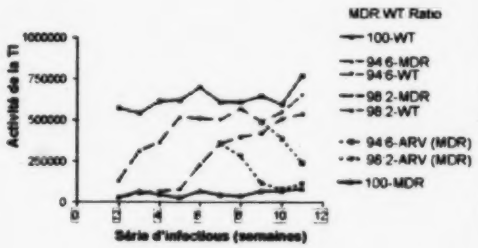
La vitalité des virus multirésistants est altérée

Diapositive 15

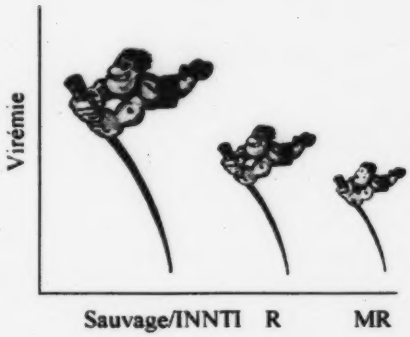
La capacité de réplication des virus multirésistants est altérée



Diapositive 16



Diapositive 17



Diapositive 18

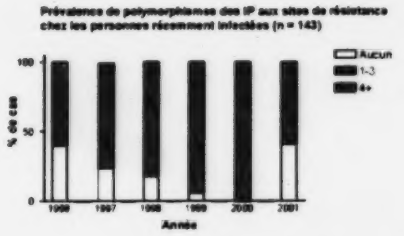
Conclusions

- 10,3 % des cas de PIV contractent des infections pharmacorésistantes
- 5,5 % des cas de PIV contractent des infections multirésistantes
- Les infections multirésistantes peuvent persister avec le temps
- Les infections multirésistantes peuvent être associées à une faible virémie
- Les infections multirésistantes sont associées à une mauvaise capacité de réplication
- 7,7 % des patients québécois souffrent d'une infection appartenant au clade non-B; 2 cas récents de PIV

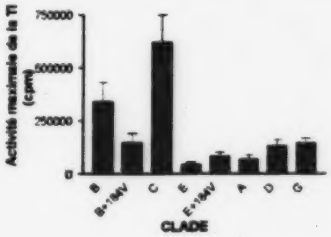
Diapositive 19

Faits nouveaux

Diapositive 20



Diapositive 21



Étude SPREAD

Dr Rob Schuurman, University Medical Centre Utrecht, Pays-Bas

Diapositive 1

Diapositive 2

Introduction : transmission

- Plusieurs rapports de cas de transmission de souches de VIH pharmacorésistantes
- Aucune définition standard de la résistance, de la population ni des tests
- Échantillons de petite taille
- Prévalence de virus pharmacorésistants chez les sujets naïfs : 10 %

Diapositive 3

Introduction : transmission

- Traitement sous-optimal
- Après une période de suppression efficace au moyen de la triple thérapie, on observe une augmentation du nombre de patients dont la virémie est détectable (étude de cohorte suisse : 10 % en 1996 c. 53 % en 1999)
- Augmentation des sous-types non-B
- Transmission du VIH qui est probablement stimulée en grande partie par des pIV

Diapositive 4

Infections à VIH nouvellement diagnostiquées : cas signalés en 2000 par million d'habitants
Région de l'Europe de l'OMS

Diapositive 5

Objectifs I

- Établissement d'un programme européen de surveillance
- Collecte de données fiables et comparables sur la transmission de la pharmacorésistance du VIH
- Mise en place d'un réseau de laboratoires de référence
- Détermination de l'incidence globale et des profils de transmission des souches pharmacorésistantes de VIH dans chaque pays avec le temps

Diapositive 6

Objectifs II

- Enquête sur l'incidence de différents sous-types de VIH et les relations avec les profils mutationnels de résistance
- Analyse des relations entre les taux de transmission et les types d'antirétroviraux pris et recommandés
- Élaboration de modèles pour prédire les tendances à venir dans la transmission de la pharmacorésistance du VIH

Diapositive 7

Population cible

- Sujets qui présentent une véritable séroconversion
  - plus intéressants du point de vue épidémiologique
  - difficiles à identifier
- Nouveaux cas diagnostiqués d'infection à VIH
  - mutations résistantes peuvent disparaître avec le temps/être corrigées
  - patients pour lesquels un test de détection de la résistance pourrait être utile dans l'immédiat
- Utilisation possible d'un test déphasé à base de peptides
- Études de membres d'une cohorte : donneurs - receveurs

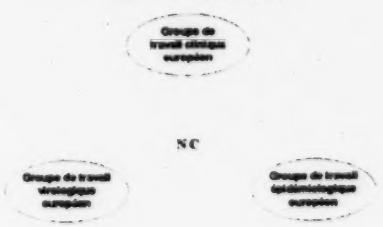
Diapositive 8

Définitions relatives à la population cible

- Sujets présentant une véritable séroconversion
  - Non exposés à un traitement antirétroviral
  - Négatifs au test ELISA et présence d'ARN du VIH dans le plasma ou
  - Positifs au test ELISA et réaction intermédiaire au Western blot
- Nouveaux cas diagnostiqués d'infection à VIH
  - Jamais exposés à un traitement antirétroviral
  - Positifs au test ELISA et présence d'ARN du VIH dans le plasma ou
  - Positifs au test ELISA et au Western blot

Diapositive 9

Infrastructure nationale dans chaque pays



Diapositive 10

Collecte de données

- Données cliniques et comportementales
  Âge, sexe, région, état immunitaire, voie et date de transmission, facteurs de risque, etc.
- Données épidémiologiques
  Prévalence et incidence nationales du VIH, distribution géographique, lignes directrices nationales pour le traitement et prise d'antirétroviraux
- Données virologiques
  Charge virale, analyse génotypique et phénotypique de la résistance, données sur le contrôle de la qualité

Diapositive 11

Détection de la résistance

- Analyse génotypique de la résistance
  - 4 000 échantillons
  - gènes de la protéase et de la TI
  - décentralisée (contrôle de la qualité par ENVA)
- Analyse phénotypique de la résistance
  - 400 échantillons
  - tests centralisés

Diapositive 12

Participants

Autriche *Puchammer Klein, Vetter*	Luxembourg *Schmit, Schneider Hemmer*
Belgique *Vandamme DeSmyter, Clumeck*	Pays-Bas *Boucher, Lange Op de Coul, Schuurman, Weisenig*
Danemark *Nielsen, Smith, Pedersen*	Norvège *Holm, Aavitsland, Ormaasen*
Finlande *Salminen, Holmström, Ruutu*	Pologne *Horban, Szata, Stanczak, Pynka*
Allemagne *Fleckenstein, Paul, Schmidt, Harrer*	Portugal *Camacho, Passo, Marsicano*
Grèce *Hatzakis, Paraskevis, Gargalianos*	Espagne *Casas, Soriano, Luz*
Irlande *Hall, Walsh, Bergin, Coughlan*	Suède *Albert, Arneborn, Lidman Sonnerborg*
Italie *Balotta, Rezza, Angarano*	R.-U. *Loveday, Phillips, Johnson*

Diapositive 13

Organisations gouvernementales participantes

Autriche :	Ministère de la Santé + Centre national de référence Institut de virologie de l'Université de Vienne
Belgique :	Laboratoire de référence pour le SIDA, Institut Rega, Université de Louvain
Danemark :	Statens Serum Institut (SSI), Copenhague
Finlande :	Institut national de santé publique, Helsinki
Allemagne :	Institut Robert Koch, Berlin + Centre national de référence pour les rétrovirus, Université d'Erlangen
Grèce :	Centre national de référence pour les rétrovirus, Athènes
Irlande :	Laboratoire virologique de référence, University College, Dublin
Italie :	Instituto Superiore di Sanità, Rome
Luxembourg :	Laboratoire National de Santé, Service national des maladies infectieuses
Pays-Bas :	Institut national de la santé publique (RIVM), Bilthoven Centre national d'évaluation du traitement du SIDA (NATEC), Amsterdam
Norvège :	Institut national de santé publique, Oslo
Pologne :	Institut national d'hygiène, Varsovie
Portugal :	Institut national de la santé (INSA), Lisbonne
Espagne :	Service des maladies infectieuses, Instituto de Salud Carlos III
Suède :	Institut suédois pour le contrôle des maladies infectieuses (SMI), Solna
R.-U. :	Medical Research Council (MRC) : en construction

Diapositive 14

Quoi de nouveau?

9 nouveaux États partenaires :

Bulgarie	Latvie
Chypre	Roumanie
République tchèque	Slovaquie
Estonie	Slovénie
Hongrie	

3 nouvelles tâches :

- Dynamique de la transmission du virus
- Rôle de la vitalité du virus dans la propagation du VIH dans les nouveaux États partenaires
- Formation et jumelage

Diapositive 15

Diapositive 16

Collaborations

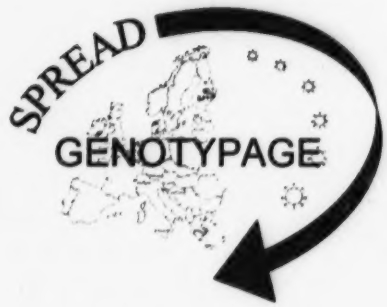
- **EuroGuidelines Group**
- **CDC**
- **Santé Canada**
- **Groupe européen pour le traitement du SIDA**
- **OMS**
- **Autres pays et organisations qui ont déjà acquis de l'expérience en ce qui concerne la transmission de la pharmacorésistance du VIH**

Diapositive 17

ÉQUIPE SPREAD

- Charles Boucher
- Annemarie Wensing
- Rob Schuurman
- Mariska Toet

Diapositive 18



Diapositive 19

Installation WP 3 et maintien d'un réseau dont la qualité est contrôlée

Objectifs

- Validation de la capacité d'exécution du génotypage de tous les laboratoires participants au début du projet
- Surveillance de la concordance inter-laboratoires dans les résultats du séquençage et l'interprétation des mutations dans le gène de la TI et de la protéase du VIH-1
- Surveillance de la variation intra-laboratoire dans l'exécution du génotypage
- Évaluation de la sensibilité et des capacités discriminatoires relatives des laboratoires en ce qui concerne la détection des génotypes mixtes

Diapositive 20

Installation WP 3 et maintien d'un réseau dont la qualité est contrôlée

Produits

- Rapport sur les critères de validation et de performance et rapports de performance tous les 12 mois
- Publication d'un rapport global d'analyse dans un article revu par un comité de lecture (fin de l'étude)

Étapes

- Mise en place d'un réseau de laboratoires de référence pour le VIH de qualité (7e mois)

Diapositive 21

Installation WP 3 et maintien d'un réseau dont la qualité est contrôlée

Approche :

- Validation des laboratoires au début du projet SPREAD (début de 2002)
- Vérification annuelle de la compétence des laboratoires (début de 2003 et 2004)
- Surveillance régulière de la performance

Diapositive 22

Installation WP 3 et maintien d'un réseau dont la qualité est contrôlée

Panel de validation - caractéristiques :

- 5 échantillons (purs et mélanges)
- Mutants porteurs de mutations multiples dans la TI et la protéase (INTI, INNTI, IP)
- Séquences provenant d'échantillons cliniques
- Mélanges définis dans le plasma humain normal (citrate ou EDTA)
- Non infectieux
- Stables à la température ambiante
- Charge virale de 5 000 copies/mL
- Teneur en ADN < 5 %
- Volume de 1 mL
- Disponible au début de 2003 et 2004

Diapositive 23

Installation WP 3 et maintien d'un réseau dont la qualité est contrôlée

Critères de validation :

- Détection correcte de toutes les mutations homogènes par rapport au TS dans un échantillon mutant complet
- Détection d'un mélange 50 % ts/mutant à plus de 75 % de toutes les positions hétérogènes

Diapositive 24

Installation WP 3 et maintien d'un réseau dont la qualité est contrôlée

Panels de vérification de la compétence :

- 5 échantillons, composition similaire au panel de validation, d'avant-garde, pour la résistance et les sous-types
- Mutants porteurs de mutations multiples de la TI et de la protéase (INTI, INNTI, IP)
- Séquences provenant d'échantillons cliniques
- Mélanges définis dans du plasma humain normal (citrate ou EDTA)
- Non infectieux
- Stables à la température ambiante
- Charge virale de 5 000 copies/mL
- Teneur en ADN < 5 %
- Volume 1 mL
- Disponible au début de 2003 et 2004

Diapositive 25

Installation WP 3 et maintien d'un réseau dont la qualité est contrôlée

Surveillance régulière de la performance (6e mois tous les ans) :

- Deux échantillons : 1 mutant (M) et 1 mélange 50 % TS/TM
- Mutations multiples dans la TI et dans la protéase (INTI, INNTI, IP)
- Séquences provenant d'échantillons cliniques
- Mélanges définis dans du plasma humain normal (citrate ou EDTA)
- Non infectieux
- Stables à la température ambiante
- Charge virale de 5 000 copies/mL
- Teneur en ADN < 5 %
- Volume 1 mL

Diapositive 26

Installation WP 3 et maintien d'un réseau dont la qualité est contrôlée

Prélèvement d'échantillons cliniques :

- Analyse de l'ARN
  - 10 mL de plasma avec EDTA aliquotes répartis dans ≥ 3 flacons et conservés à –70° C (GT, PT, VL, etc.)
    - Échantillonnage longitudinal pour étudier la réversion
    - Étude des résultats pour évaluer le succès du traitement
- Analyse de l'ADN
  - 3 x 500µl sang total (EDTA) conservé à -70° C (GT)
    - archive de mutations
    - Q. prévalence plus élevée de mutations de résistance
    - sous-étude

Méthodes de laboratoire disponibles pour l'analyse de la résistance aux médicaments à des fins de surveillance

Technologies actuelles d'identification de la résistance aux médicaments

M. Tim Gleeson, Laboratoire national de la génétique du VIH, Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses, Santé Canada

Diapositive 1

Techniques actuelles d'identification de la pharmacorésistance

Laboratoire national de la génétique du VIH

Tim Gleeson
Rick Barrette
Isabelle Jeanne

Laboratoire national de la génétique du VIH

Diapositive 2

Méthodes

Prédiction et identification de la pharmacorésistance

- Méthodes phénotypiques
  - Déterminer les caractéristiques biologiques ultimes d'un micro-organisme dans un environnement donné
- Méthodes génotypiques
  - Examiner les marqueurs génétiques d'une caractéristique biologique ou d'un phénotype donné

Laboratoire national de la génétique du VIH

Diapositive 3

Systèmes phénotypiques

- Analyses de la pharmacorésistance bien comprises
  - Analogie aux tests phénotypiques des effets des antibiotiques sur des bactéries
  - « concentration donnée d'un agent inhibiteur, degré de croissance par rapport au type sauvage
- Mesure du pouvoir inhibant d'un médicament effectué *in vitro*
- Mesure directe de la résistance

Laboratoire national de la génétique du VIH

Diapositive 4

Systèmes commerciaux de phénotypage

- Deux entreprises ont mis au point des systèmes standardisés
  - Virus et vecteurs
- Systèmes pouvant être associés à une forte capacité
- Production d'un virus recombinant
  - Protéase, une bonne partie de la TI et une partie de gag dans un virus recombinant dérivé du gène pol
  - Infection d'une lignée cellulaire par un inoculum standardisé et mesure de la réplication (CI50)

Diapositive 5

Inconvénients des épreuves phénotypiques

- Délai
- Le phénotypage du VIH prend de 2 à 6 semaines
- Demeure d'utilité limitée pour la prise en charge clinique
- Coût
- Coût élevé
- Crainte de la main-d'œuvre associée aux cultures et coûts des installations
- Évolution en temps réel du VIH
- Sous la pression exercée par les médicaments, le virus peut évoluer et devenir résistant
- Artefact du processus
- Activité antivirale des INTI varie *in vitro* par rapport à *in vivo*
- Virus recombinants qui peuvent ne pas être optimaux
- Hétérodimère à TIP modifié par des mutations aux sites de clivage *gag-pol*
- Quatre sites de clivage de la protéase chez un patient. Y dans un virus contenant en hétérozygote
- Peut ne pas détecter les mutations compensatoires du patient à ces 5 sites, ce qui pourrait donner des résultats mentant au test de sensibilité aux médicaments

Diapositive 6

Épreuves génotypiques

- Épreuves faisant appel au séquençage
- Recherche des mutations génétiques
- Coût relativement faible
- Ne nécessitent pas de confinement de biosécurité
- Mesure indirecte de la sensibilité aux médicaments
- Prédiction de la résistance
- Détection des mutations dans des mélanges même à des concentrations trop faibles pour les épreuves phénotypiques
- Interaction des mutations de résistance

Diapositive 7

Systèmes commerciaux de génotypage

- Affymetrix GeneChip
- Séquençage par hybridation (protéase et 1 200 bases de la TI)
- Système INNO-LiPA (Innogenetics)
- Recherche des mutations génétiques par des sondes spécifiques
- Effectuée sur des membranes de nitrocellulose
- ABI ViroSeq et Visible Genetics Trugene
- Séquençage en cycle par la didésoxynucléotide (protéase et 960 premières bases de la TI (ARN) ou protéase et bases 120-*4 de la TI (VGI)

Diapositive 8

Inconvénients des systèmes de génotypage

Affymetrix GeneChip

- Supposent que l'on connaisse déjà le polymorphisme attendu
- Difficulté associée à la variabilité génétique du VIH
- Moins fiables que le séquençage par la didésoxynucléotide pour la détection de mutations
- Incapable de détecter les insertions ou délétions
- Peu fiable pour le séquençage des sous-types autres que le sous-type B sur lequel s'est fondée l'écriture de la puce

Diapositive 9

Inconvénients des systèmes de génotypage

INNO-LiPA (Innogenetics)

- Limites
- Ne détectent qu'un sous-ensemble de mutations de la pharmacorésistance
- Taux de 10 % de résultats non interprétables
- Susceptibles de survenir dans le cas de mutations peu fréquentes à des points clés

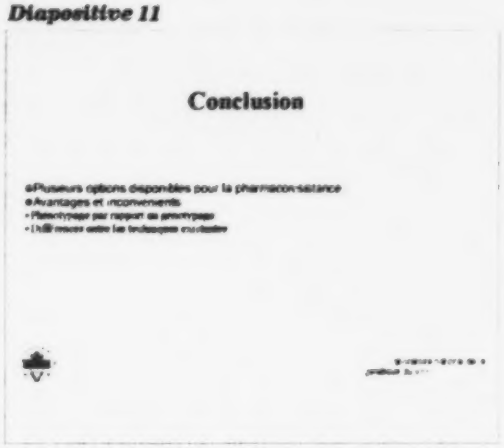
Diapositive 10

Inconvénients des systèmes de génotypage

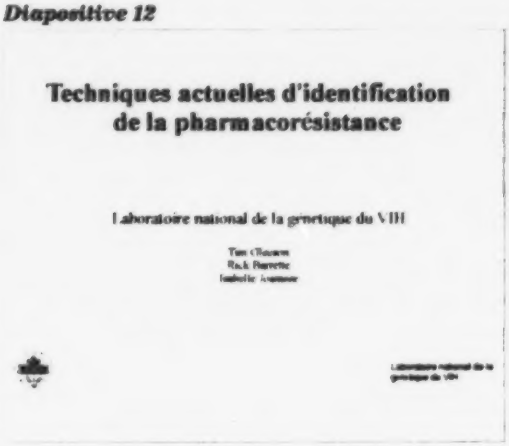
ABI ViroSeq et Visible Genetics Trugene

- Demandent un équipement spécialisé pour exécuter la technique
- Thermocycleurs, cuvettes de gel, séquenceurs spécifiques
- Capacité limitée
- Limites relatives à la longueur de lecture, réactions requises
- Coûts modérés

Diapositive 11



Diapositive 12



Évaluation des tests de résistance génotypique aux médicaments

M. Richard Pilon, Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses, Santé Canada

Diapositive 1

Évaluation des tests génotypiques de détection de la pharmacorésistance

Richard Pilon

Diapositive 2

Renseignements de base

- Les tests de détection de la pharmacorésistance sont de plus en plus importants dans le traitement de l'infection à VIH.
- Le développement d'une résistance aux médicaments mène à un échec virologique.
- L'information sur le génotype de résistance du VIH peut améliorer l'issue des traitements (VIRADAPT)

Diapositive 3

Méthodes disponibles

- Faisant appel au séquençage
  1. Perkin-Elmer ViroSeq
  2. Visible Genetics TRUGENE^{SM} Assay.
  3. Méthodes de séquençage maison.
- Faisant appel à l'hybridation (LiPA)
- Phénotypage : culture, épreuves *in vitro*.

Diapositive 4

Objectifs

1. Créer un panel représentatif d'échantillons de plasma provenant de 100 patients infectés par le VIH-1
   - 40 patients - 3 antirétroviraux, échec virologique, charge virale élevée (> 50 000).
   - 40 patients - 3 antirétroviraux, échec virologique, charge virale faible (> 1 000 et < 10 000).
   - 10 patients n'ayant jamais pris des ART, séropositifs depuis au moins 5 ans, charge virale élevée (> 50 000).
   - 10 patients n'ayant jamais pris des ART, séropositifs depuis au moins 5 ans, charge virale faible (> 1 000 et < 10 000).

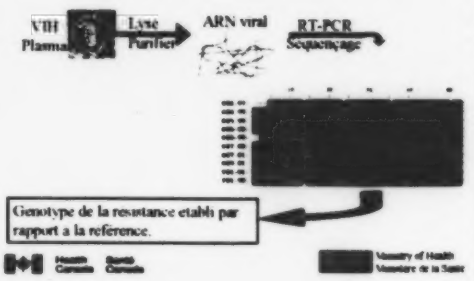
Diapositive 5

Objectifs

2. Évaluer deux tests commerciaux (Perkin-Elmer et Visible Genetics) dans deux laboratoires différents et les comparer au séquençage maison de plusieurs clones provenant de chaque échantillon (étalon de référence).
3. Établir le phénotype d'un sous-ensemble à des fins de comparaison avec le génotype.
4. Exploiter les résultats afin de faciliter l'élaboration de programmes d'analyse génotypique du VIH.

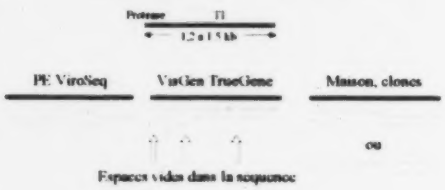
Diapositive 6

Génotypage de la résistance



Diapositive 7

Réactions de séquençage



Diapositive 8

Génotype

Différences dans l'évaluation la présentation du génotype.

- Perkin-Elmer : Énumère toutes les mutations déjà associées à une pharmacorésistance, sans interprétation.
  N'établit pas de distinction entre mutations primaires et secondaires.
- Visible Genetics : Indique la résistance relative au panel de médicaments de même que les mutations et leur impact. Fondé sur l'information contenue dans une base de données.

Diapositive 9

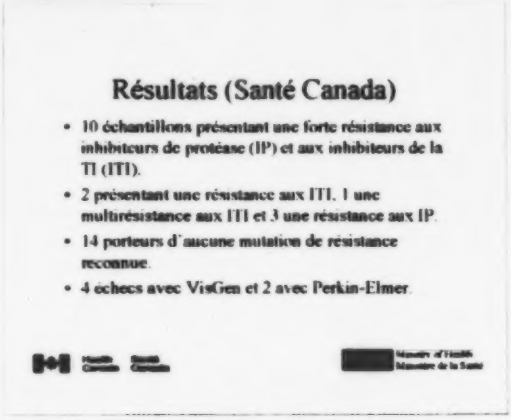
- Méthode maison/clones : plusieurs ressources de référence en ligne (bases de données) utilisées pour évaluer la résistance à divers médicaments.

Diapositive 10

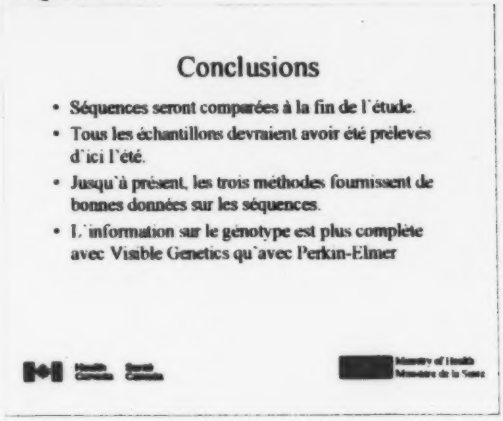
État de la situation

- 32 échantillons prélevés.
- Santé Canada : Tests VisGen et PE effectués sur tous les échantillons jusqu'à maintenant.
- 6 clones pour chacun des 20 préparés.
- Les laboratoires ne possèdent pas d'information sur les échantillons. Comparaisons non encore effectuées.

Diapositive 11



Diapositive 12



Comptes rendus des laboratoires provinciaux de santé publique

Alberta

Linda Chui, Microbiology and Public Health Laboratory, University of Alberta Hospital

Diapositive 1

Perspectives des laboratoires provinciaux de santé publique

Linda Chui

Diapositive 2

Tests moléculaires de détection du VIH

1997- Mesure de la charge de VIH par Roche Amplicor[MC]

1999- 2001 Génotypage effectué par le BC Center for Excellence in HIV/AIDS

2001- Génotypage effectué à Edmonton

Diapositive 3

Résultat du génotypage

Année	N[bre] testés	N[bre] d'échecs (%)
1999	49	7 (14,3)
2000	65	8 (12,3)
2001	78	7 (9,0)

Diapositive 4

Génotypage dans le nord de l'Alberta

2002 : Trugene[MC] par Visible Genetics
15 échantillons inclus dans l'étude de validation

Diapositive 5

Trugene[MC]

- Préparation des échantillons
- Amplification
- Séquençage bidirectionnel CLIP[MC]
- Analyse

Diapositive 6

Inhibiteurs nucléosidiques de la TI

- Zidovudine
- Didanosine
- Zalcitabine
- Lamivudine
- Stavudine
- Abacavir

Tenofovir
Foscarnet

Diapositive 7

Inhibiteurs non nucléosidiques de la TI

- Névirapine
- Délavirdine
- Efavirenz

Diapositive 8

Inhibiteurs de protéase

- Indinavir
- Ritonavir
- Nelfinavir
- Amprénavir
- Saquinavir

Lopinavir avec Ritonavir

Diapositive 9

Résultat

- 13/15 : concordance
- 2/15 non-concordance :
  - 1 : infection mixte détectée par Trugene[MC] et résistance démontrée mais Virco s'est révélé sensible
  - 1 : échec avec Virco
- Résultat de la concordance :
  - Délétion au niveau du codon 69 détectée par Trugene
  - 2 cas de résistance signalés par Trugene[MC] mais indiqués comme « probables » par Virco

Diapositive 10

Résumé

- Étude de validation en cours
- Demande beaucoup de main-d'œuvre
- Coûteux
- Échange de données?
- Standardisation?
- Vérification de la compétence?

Méthodes standardisées d'identification des mutations utiles pour la surveillance de la résistance aux médicaments

Méthode adoptée par le Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses pour identifier les mutations de résistance aux médicaments anti-VIH à des fins de surveillance

M. Tim Gleeson, Laboratoire national de la génétique du VIH, Centre de prévention et de contrôle des maladies infectieuses, Santé Canada

Diapositive 1

Identification des mutations de la pharmacorésistance au LNGV

Laboratoire national de la génétique du VIH

Tim Gleeson
Rick Barrette
Isabelle Jouanne

Diapositive 2

Programme canadien de surveillance des souches et de la résistance aux médicaments ayant trait au VIH (PCSSRMV)

Diapositive 3

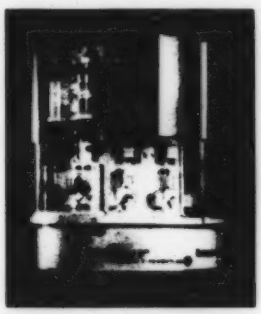
Objectifs du PCSSRMV en laboratoire

Diapositive 4

Algorithme pour les tests génétiques

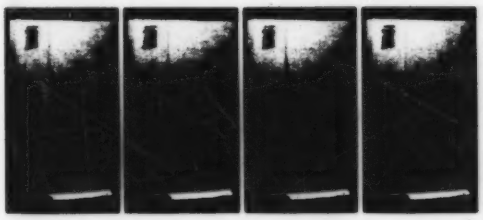
Diapositive 5

Extracteur



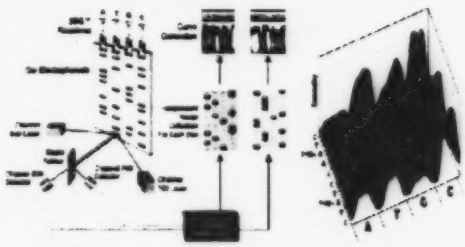
Diapositive 6

Séquenceurs LiCor



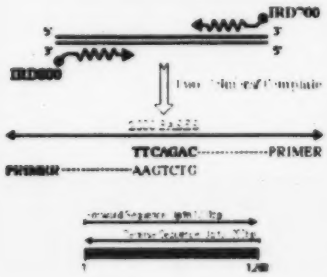
Diapositive 7

Séquençage automatique de l'ADN Li- Cor

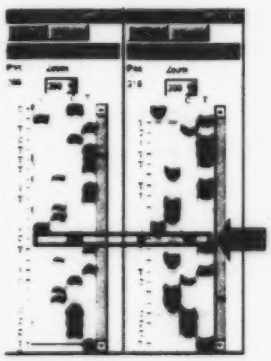


Diapositive 8

Séquençage bidirectionnel simultané (SBS)



Diapositive 9



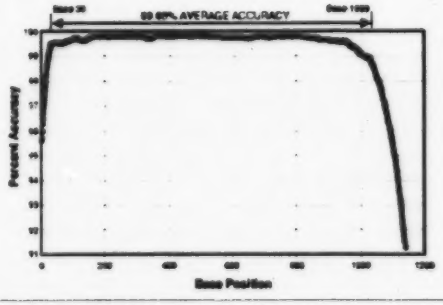
Confirmation des séquences chevauchantes

- Les séquences chevauchantes permettent la résolution des ambiguïtés de configuration
- Compressions de la CG
- Arrêts à voies multiples
- Boucles en épingles à cheveux thermostables

- Différences par rapport à l'hétéroxygote présente dans les deux brins

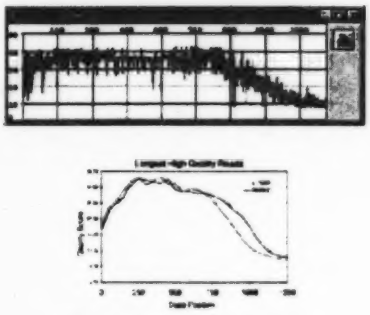
Diapositive 10

Exactitude



Diapositive 11

Qualité



Diapositive 12

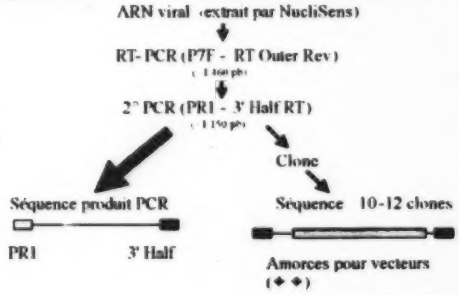
Organisation du génome du VIH

Diapositive 13

Analyse du gène *pol*

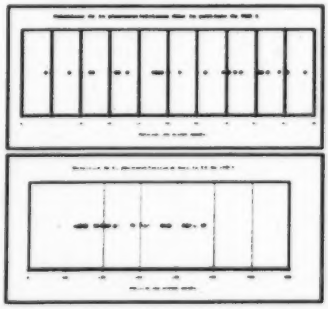
Diapositive 14

Protocole de séquençage de la pharmacorésistance du PCSSRMV



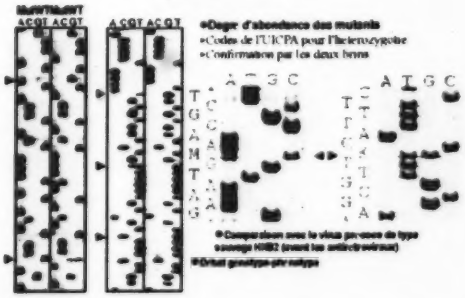
Diapositive 15

Ampleur des mutations de la pharmacorésistance



Diapositive 16

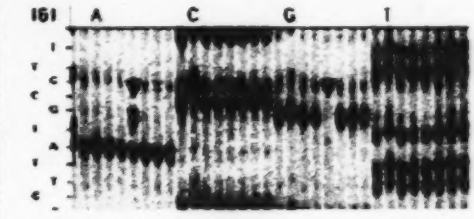
Détection de la résistance aux antiviraux



Diapositive 17

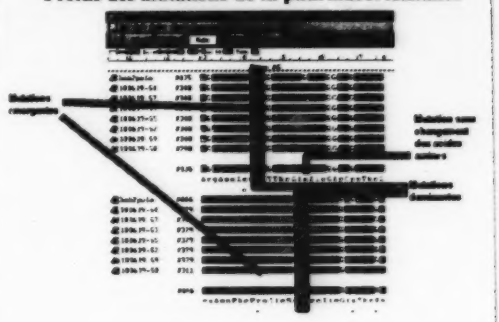
Détection rapide de mutants

- Réduction de la charge de travail
- Augmentation de la capacité
- Li-Cor peut définir les voies peu importe les clivages



Diapositive 18

Profils des mutations de la pharmacorésistance



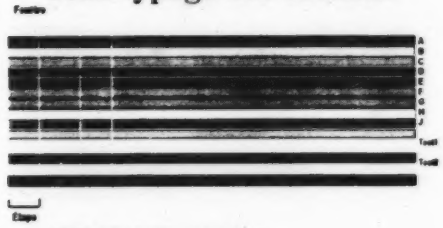
Diapositive 19

Logiciel d'analyse des séquences

- **Sous-typage de surveillance**
  - BLAST
- **Relations phylogénétiques détaillées**
  - Alignements CLUSTAL, arbres NJ
  - VESPA pour profils de signature
- **Recombinaison**
  - BLAST
  - RIP

Diapositive 20

Sous-typage des souches



- **BLAST : Basic Local Alignment Search Tool (outil de recherche des alignements locaux de base)**
  - Altschul et coll., 1990 – dérivés et mises à jour
  - Protéines et acides nucléiques
  - Interprétation statistique robuste qui tient les bruits de fond
  - Alignements avec espaces vides inclusibles
  - Alignements locaux contre globaux, détection des recombinaisons

Diapositive 21

Relations phylogénétiques

- **CLUSTAL (D. Higgins, J. Thompson : EMBL)**
  - Alignement optimisé avec des paramètres définis par l'utilisateur
  - Alignement relativement rapide
  - Capacité intégrée de traçage des arbres par la méthode Neighbor-Joining
  - CLUSTALV (utilisé dans de nombreuses trousses commerciales) avait des problèmes avec des longueurs différentes de séquence et des problèmes de pondération. Corrigés dans CLUSTALW
- **VESPA (Viral Epidemiology Signature Pattern Analysis) (LANL)**
  - Détecte les nucléotides (ou acides aminés) atypiques dans un ensemble recherché par rapport à un ensemble de séquences de référence
  - Outil d'analyse médico-légale et d'analyse des grappes épidémiologiques

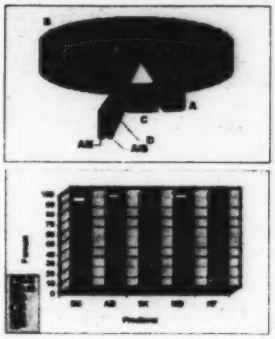
Diapositive 22

Recombinaison virale

- **RIP : Recombination Identification Program (LANL)**
  - Fenêtre mobile comme dans BLAST
  - Une base à la fois plutôt qu'un paramètre BLAST défini par l'utilisateur
  - Similaire mais pas identique à la valeur donnée dans BLAST et les tests de signification statistique
  - BLAST spécialisé c. plus générique
- **Étapes subséquentes**
  - Analyse phylogénétique de chaque fragment
  - Vérification des groupements dans des branches séparées de l'arbre
  - Bootstrapping des valeurs pour indiquer la robustesse

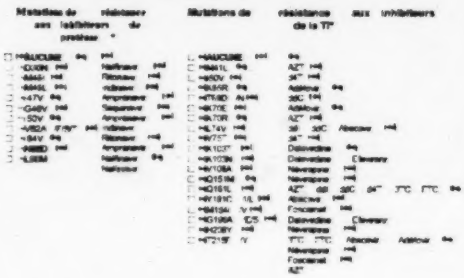
Diapositive 23

Résultats du sous-typage du VIH



Diapositive 24

Mutations primaires



Diapositive 25

Mutations de résistance

93,1 % des sujets dans l'échantillon (N=430) étaient infectés par une souche du VIH-1 porteuse de mutations primaires de pharmacorésistance

Diapositive 26

L'avenir

● Travaux ultérieurs sur des échantillons « intéressants »
- Nouvelles series d'amorces
- Séquence pleine longueur

● Développement technologique
- Détection des sous-types/pharmacorésistance ne faisant pas appel au séquençage
- Codes à barres fluorescents

● Analyse des données
- Échantillons intéressants
- Profils de signature
- Grappes
- Infections doubles
- Points intéressants

Diapositive 27

Conclusions

● **Algorithme**

- De l'extraction à l'amplification
- Du clone ou du produit PCR à la séquence
- Longueur et exactitude de la lecture

● **Analyse**

- SBS ≻ confirmation de la séquence
- Logiciels pour une analyse rapide mais robuste
- Outils spécialisés pour une analyse approfondie sur demande

Diapositive 28

Identification des mutations de la pharmacorésistance au LNGV

Laboratoire national de la génétique du VIH

Tim Gleeson
Rick Barrette
Isabelle Joanisse

10 Indicateurs moléculaires de la transmission de la résistance (IMTR)

Dr Rob Schuurman, University Medical Centre Utrecht, Pays-Bas

Diapositive 1

Indicateurs Moléculaires de la Transmission de la Résistance (IMTR)

Objectifs

- Définir des critères consensuels pour l'identification de la transmission de la pharmacorésistance
- En fonction de ces critères, élaborer un algorithme qui permet l'analyse des séquences chez le patient afin de déceler la présence d'Indicateurs Moléculaires de la Transmission de la Résistance (IMTR)
- Publier, diffuser et utiliser ces critères dans toutes les études ultérieures sur la transmission de la résistance (comparabilité!)
- Créer un logiciel (accessible sur le Web) pour l'identification facile des IMTR dans des échantillons cliniques et l'utiliser dans toutes les études sur la transmission
- Mise à jour continue des règles

Diapositive 2

Indicateurs Moléculaires de la Résistance

Objectifs :

- Identification des polymorphismes nucléotidiques (qui peuvent être) associés à une réduction de la sensibilité aux médicaments
- Elaborer un algorithme qui permet l'analyse de séquences chez le patient afin de déceler la présence d'Indicateurs Moléculaires de la Résistance à trois niveaux
  - niveau scientifique
  - niveau épidémiologique
  - niveau clinique
- Mise à jour continue des règles

Diapositive 3

Indicateurs Moléculaires de la Résistance

Niveau scientifique

- Identifier tous les changements importants (nucléotides) par rapport à une base de données (par sous-type) sur les échantillons historiques de l'ère pré-médicaments (ou cohortes annuelles rétrospectives)
  - permettra l'identification de nouvelles mutations (associées à une résistance ou non)
  - permet d'étudier l'histoire naturelle de l'épidémie d'infection à VIH (chance unique!)
  - produit une vaste base de données sur les séquences provenant d'échantillons cliniques qui pourra être utilisée dans les études à venir
  - devrait être complété par une étude de la sensibilité aux médicaments

Diapositive 4

Indicateurs Moléculaires de la Résistance

Niveau épidemiologique

- Déterminer l'hétérogénéité des séquences de nucléotides au niveau de codons de « résistance » spécifiques
  - comparaison avec une base de données (par sous-type) sur des échantillons historiques de l'ère pré-médicaments (ou cohortes annuelles rétrospectives)
  - comprend des mutations primaires et secondaires, des revertants de même que des variants naturels au niveau de ces codons
  - sera basé sur une liste predefinie de numéros de codon et de séquences
  - identifie les profils de mutations associées (secondaires)

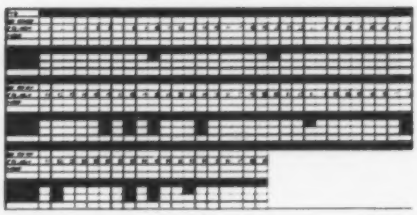
Diapositive 5

Indicateurs Moléculaires de la Résistance

Niveau clinique
- Déterminer les indicateurs moléculaires de la transmission de la résistance en effectuant une analyse d'une liste spécifique de codons de « résistance »
  - comparaison avec une liste consensuelle (par sous-type) de codons de résistance, y compris
    - IMTR primaires (IMTR-Pri)
    - IMTR secondaires (IMTR-Sec)
    - IMTR réversion (IMTR-Rev)
- Transmission de la résistance définie par
  - présence d'un ou plusieurs IMTR Pri soit dans la TI ou dans la protéase
  - présence d'une combinaison d'IMTR Sec (TI 3? protéase 5?)
  - présence d'un ou plusieurs IMTR-Rev soit dans la TI ou la protéase

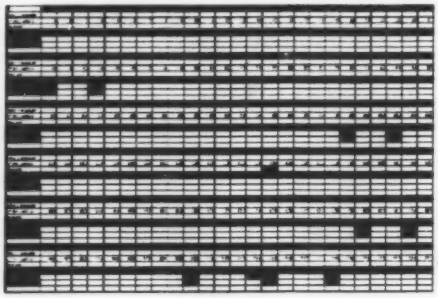
Diapositive 6

Algorithme d'interprétation
sous-type B de la protéase



Diapositive 7

Algorithme d'interprétation
sous-type B de la TI



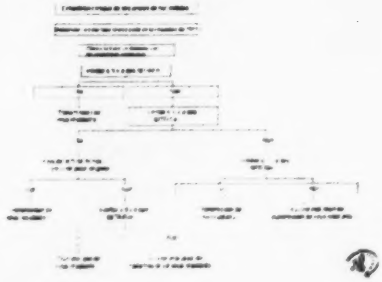
Diapositive 8

Plan opérationnel

- Initiative conjointe SPREAD-CDC-SC (définir le groupe de travail) — mars 2002
- Préparer un plan pour l'interprétation consensuelle (incluant toutes les mutations) — avril/mai 2002
- À présenter au consortium lors de la réunion à Barcelone (juillet 2002) — juillet 2002
- Présenter le consensus aux autres parties concernées (OMS, IAS, etc.) — juillet 2002
- Créer un logiciel accessible sur le Web pour l'analyse standardisée en fonction des critères consensuels — août 2002
- Diffuser et publier les résultats — automne 2002

Diapositive 9

Analyse clinique des IMTR



Diapositive 10

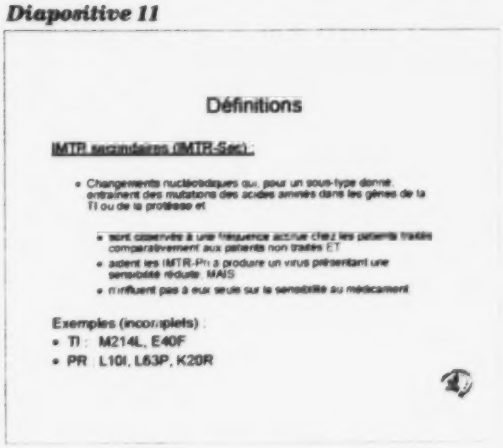
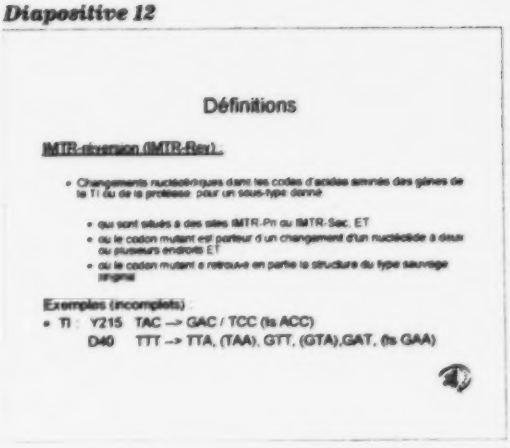
Définitions

IMTR primaires (IMTR-Pri) :

- Changements nucléotidiques entraînant des mutations des acides aminés dans les gènes de la TI ou de la protéase qui, pour un sous-type donné
  - n'ont pas été observés chez des patients non traités ou au moins à une fréquence < ? % (?) ET
  - modifient à eux seuls la sensibilité à un ou plusieurs antiviraux

Exemples (incomplets) :
- TI : M184V, T215Y, M41L, K103N, Q151M (Y181C pour le sous-type B, pas pour A et C?)
- PR : D30N, M48V, V82A, L90M

Diapositive 11



Diapositive 12